UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES SCIENCES MÉDICALES

1972 — N° 1

CONCEPTION D'UN MODÈLE MOLÉCULAIRE DE L'INSULINE AU REGARD DE SON MODE D'ACTION

Question proposée par la Faculté

LES PLACEBOS

THÈSE POUR LE DOCTORAT D'ÉTAT EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 1er mars 1972

PAR

Michelle ESPAGNE-GOULARD

PHARMACIEN

DIPLÔMÉE DES C.E.S. DE CONTRÔLE PHYSICO-CHIMIQUE
DES MÉDICAMENTS ET DE TOXICOLOGIE ET HYGIÈNE INDUSTRIELLE

ANCIEN ASSISTANT DE FACULTÉ - ASSISTANT DES HÔPITAUX

née le 17 septembre 1942 à Foussais (Vendée)

Examinateurs de la thèse :

MM. F. TAYEAU ..... *Président.*

J.-C. COLLETER .....

R. JENSEN ..... *Juges.*

J. AUBERTIN .....

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543917_0013

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES SCIENCES MÉDICALES

1972 — N° 1

CONCEPTION D'UN MODÈLE MOLÉCULAIRE DE L'INSULINE AU REGARD DE SON MODE D'ACTION

Question proposée par la Faculté

LES PLACEBOS

THÈSE POUR LE DOCTORAT D'ÉTAT EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 1er mars 1972

PAR

Michelle ESPAGNE-GOULARD

PHARMACIEN

DIPLÔMÉE DES C.E.S. DE CONTRÔLE PHYSICO-CHIMIQUE
DES MÉDICAMENTS ET DE TOXICOLOGIE ET HYGIÈNE INDUSTRIELLE

ANCIEN ASSISTANT DE FACULTÉ - ASSISTANT DES HÔPITAUX

née le 17 septembre 1942 à Foussais (Vendée)

Examinateurs de la thèse :

MM. F. TAYEAU ..... *Président.*

J.-C. COLLETER .....

R. JENSEN ..... *Juges.*

J. AUBERTIN .....

1972

UNIV.
LEIDEN

A tous ceux

dont l'affection m'est chère

A nos Juges

Monsieur le Professeur J.C COLLETER

Professeur de Chimie Analytique
Licencié ès Sciences
Chevalier des Palmes Académiques

Monsieur le Professeur agrégé R. JENSEN

Maître de Conférences Agrégé de Chimie Biologique
Biologiste des Hôpitaux
Docteur ès Sciences
Chevalier des Palmes Académiques

Monsieur le Docteur J. AUBERTIN

Maître de Conférences Agrégé de Médecine Générale
Médecin des Hôpitaux (Maladies infectieuses)
Docteur ès Sciences

Vous avez bien voulu accepter de siéger à notre jury de thèse.

Nous vous exprimons nos plus sincères remerciements et notre profonde gratitude.

A notre Président de thèse

Monsieur le Professeur F. TAVEAU

Doyen honoraire de la Faculté de Médecine et de Pharmacie
Professeur de Biochimie Médicale A
Membre correspondant de l'Académie Nationale de Médecine
Médecin biologiste des Hôpitaux, Chef de Service
Docteur ès Sciences
Officier de la Légion d'Honneur
Commandeur des Palmes Académiques
Officier de l'ordre National du Mérite
Chevalier de la Santé Publique
Chevalier du Mérite agricole
Médaille de Vermeil du service de Santé de la Marine
Officier du Mérite Scientifique
Grand Croix de l'Ordre du Saint Sépulcre de Jérusalem
Commandeur de l'Ordre National Sénégalais
Titulaire de l'Ordre Sapasse (1ère classe) (Iran)
Titulaire (2ème degré) de la décoration Danesch (Iran)
Chevalier de l'Ordre National du Cèdre (Liban)
Docteur Honoris Causa de l'Université de Téhéran (Iran)

Vous nous avez réservé le meilleur accueil dans votre laboratoire.

Vous avez bien voulu nous faire le grand honneur de présider notre jury de thèse.

Veuillez trouver ici l'expression de notre très respectueuse reconnaissance.

A V A N T - P R O P O S

La mise à la disposition des biochimistes d'appareils de mesure moins onéreux et toujours plus précis, l'apparition de nouvelles techniques d'analyses, chromatographie, électrophorèse, spectrophotométrie ont bouleversé les méthodes d'investigation médicale depuis une trentaine d'années. La plupart des recherches, naguère considérées comme irréalisables, sont à la portée de beaucoup de laboratoires et, actuellement, non seulement les biochimistes peuvent copier la nature mais encore créer de toutes pièces des molécules biologiques. Les progrès sont de plus en plus rapides et cette évolution est particulièrement nette dans le domaine du diabète.

Que l'on veuille bien songer qu'entre les premiers travaux de CLAUDE BERNARD sur cette maladie et l'isolement de l'hormone pancréatique il s'est écoulé plus de quarante ans, vingt ans ont été nécessaires pour analyser l'insuline et huit ans seulement ont suffi pour réaliser la synthèse entière de la molécule et de ses analogues.

Ces résultats n'ont pu être obtenus que par un perpétuel échange entre les observations cliniques et les techniques d'études biochimiques. Actuellement nos connaissances se sont étendues à la biosynthèse de l'hormone, à son action biologique et à ses propriétés antigéniques.

L'étude de l'insuline a été rapidement considérée comme un élément capital de la recherche dans la pathogénie du diabète. Tout de suite le dosage de l'insuline circulante s'est révélé extrêmement difficile pour deux raisons : la structure de la molécule ne présente pas de sites permettant une réaction caractéristique spécifique (réaction colorée par exemple) et de plus la très faible concentration de l'hormone dans le sang ne facilite pas sa détermination. En 1960 seulement, l'emploi d'une technique immunologique et l'utilisation de radioisotopes (iode 131), ont permis de résoudre spectaculairement ce problème. Cependant la méthode radioimmunologique nécessite un appareillage très spécialisé et se prête mal aux dosages en série, absolument nécessaires au cours d'une épreuve d'hyperglycémie par exemple.

La mise au point de méthodes d'analyses de plus en plus rapides et précises a toujours été le sujet de travaux de recherches de notre maître, Monsieur le Professeur Agrégé JENSEN, pour améliorer sans cesse le nombre et la qualité des analyses effectuées dans son laboratoire de Biochimie de l'Hôpital Saint André à Bordeaux. Il était normal que le problème de l'insulinémie ne le laissât pas indifférent. Aussi après nous avoir permis de nous familiariser avec le dosage radioimmunologique° de l'insuline au laboratoire de Monsieur le Professeur BLANQUET sous la direction du Professeur AUBERTIN, Monsieur le Professeur JENSEN nous proposa la mise au point d'une méthode de dosage biochimique de l'insuline, plus rapide que la méthode radioimmunologique.

Nous avons poursuivi nos travaux au laboratoire de Biochimie Médicale A, U.E.R. I, de l'Université de Bordeaux II. Les difficultés rencontrées pour l'élaboration de cette technique nous ont amenée à étudier la structure moléculaire de l'insuline et à proposer un mécanisme d'action de cette hormone. C'est l'ensemble de ces recherches qui constitue l'objet de notre thèse.

° *Ce travail a été réalisé au laboratoire des radioisotopes de l'Hôpital Saint André.*

Nous avons jugé nécessaire, dans la première partie de notre rédaction, de dresser un bilan des connaissances actuelles sur la molécule d'insuline. Nous envisagerons successivement la structure de cette molécule (Chapitre I) son métabolisme (Chapitre II) et ses propriétés physiologiques (Chapitre III) avant de rappeler les principales méthodes de dosage de l'insulinémie actuellement utilisées (Chapitre IV).

Dans une seconde partie nous exposerons nos travaux personnels. Après avoir décrit la technique radioimmunologique que nous avons utilisée (Chapitre I) nous rapporterons les expériences que nous avons réalisées en mesurant la consommation du glucose par les cellules isolées de divers tissus de rat en présence d'insuline (Chapitre II). Les résultats nous conduiront à envisager les relations entre l'activité de l'hormone et la structure des membranes (Chapitre III) et à proposer un modèle moléculaire de l'insuline (Chapitre IV).

Nous ne saurions terminer cet avant-propos sans remercier tous ceux qui par leur compétence et leurs connaissances nous ont aidée à mener à bien ce travail.

Nous voulons remercier en premier lieu le Docteur MOUNIER qui nous a honorée de sa confiance et a bien voulu nous réserver son bienveillant appui à la fin de nos études pharmaceutiques.

Nous nous adressons tout particulièrement à Monsieur le Professeur Agrégé JENSEN grâce auquel nous pouvons présenter aujourd'hui ce travail. Depuis notre entrée au Laboratoire de Biochimie Médicale A, il ne nous a ménagé ni son temps, ni ses conseils. Il a su nous former et nous intéresser à la recherche et nous a guidée pas à pas dans l'apprentissage de techniques analytiques souvent complexes. Il nous a donné la possibilité de travailler dans son service à l'Hôpital Saint André où nous avons pu nous familiariser avec l'analyse hospitalière moderne.

Il a bien voulu nous honorer de son amitié, nous soutenir et nous encourager dans des moments difficiles. Qu'il trouve ici témoignage de notre gratitude.

Il nous est agréable de remercier Monsieur le Professeur agrégé AUBERTIN qui, avec la plus grande amabilité, nous a donné la possibilité de nous initier au dosage radioimmunologique de l'insuline et qui, malgré ses nombreuses activités, a toujours su trouver le temps de s'intéresser à nos travaux, et de nous faire profiter de ses connaissances.

Notre reconnaissance va également à Monsieur le Doyen TAYEAU qui a accepté dans son laboratoire, il y a six ans, la jeune élève que nous étions alors. Bien que ses occupations ne nous aient pas permis de bénéficier autant que nous l'aurions souhaité de son brillant enseignement et de ses précieux conseils, il nous a toujours manifesté la plus extrême bienveillance. Il a bien voulu accepter de présider notre jury de thèse. Qu'il trouve ici l'assurance de notre profond respect.

Nous remercions Monsieur le Professeur NEUZIL qui nous a permis de trouver, dans sa remarquable collection de Chemical Abstracts, un outil de travail précieux.

C'est avec l'aide de Monsieur le Professeur CANELLAS que l'expérimentation de cette thèse a pu être réalisée. Il a mis aimablement à notre disposition les ressources de son laboratoire. Nous lui exprimons nos remerciements.

Enfin nous ne saurions oublier nos camarades du laboratoire de Biochimie Médicale A parmi lesquels a toujours régné une atmosphère d'excellente amitié. Nos remerciements vont en particulier à Mademoiselle QUATTROCCHI pour l'aide technique qu'elle nous a apportée dans la réalisation de ce travail, et à Mademoiselle FLORENTIN qui avec beaucoup de patience et la plus grande gentillesse a assuré la dactylographie d'un texte souvent difficile.

I N T R O D U C T I O N

Pour la première fois en 1921, BANTING et BEST (14) isolèrent à partir d'extraits alcooliques de pancréas de chien, une substance capable de réduire l'hyperglycémie des diabétiques. Cette découverte amena un profond bouleversement dans l'histoire de cette maladie et de son traitement.

Le diabète, du grec " διαβητησ " "passer à travers" était connu depuis la plus haute antiquité. Un papyrus égyptien datant de 1500 avant J.C., décrivait déjà un trouble caractérisé par l'émission d'urines profuses. Des écrits chinois et arabes faisaient également mention d'observations semblables et la présence d'une substance "sucrée" dans l'urine de diabétiques avait été pressentie par l'Arabe AVICENNE lorsqu'il précisait que celle-ci avait une "saveur de miel" (147).

Mais, pendant très longtemps en Europe, le terme de diabète ne s'est pas appliqué à une maladie bien définie ; il a davantage caractérisé une affection appartenant au groupe des "troubles des humeurs". Sous ce terme, on désignait un ensemble de maladies caractérisées par certains signes généraux : polydipsie, polyphagie, fonte tissulaire, polyurie et dont l'évolution conduisait rapidement à une issue fatale. Dans certains cas, on notait chez les malades la saveur "mielleuse" de l'urine mais c'est seulement au 17ème siècle que s'imposa la notion de sucre urinaire. RENOLD (151) rapporte que WILLIS en 1674, introduisait le terme de diabète sucré "Diabètes Mellitus" par opposition au diabète insipide, caractérisé par l'émission abondante d'urines non "sucrées".

Les symptômes majeurs du diabète n'ont été mis en évidence qu'avec la découverte de la glycémie et de l'acidocétose. DOBSON (49) en 1776 déclarait que la "matière sucrée excrétée par le rein lors du diabète n'est pas formée dans l'organe sécréteur mais préexiste dans le sérum". En 1835 AMBROSIANI montre que le sang de diabétiques contient plus de "sucre" que le sang de sujets normaux et en 1870 CLAUDE BERNARD assure que "le trouble de la fonction glycogénique du foie commande toute la pathogénie du diabète dont elle est le fondement" (147).

Le rôle central de l'hyperglycémie, aujourd'hui encore signe cardinal de l'affection, s'imposa alors, complété par la suite de la notion d'acidose. La découverte de l'acétone dans l'urine fut suivie de la mise en évidence par STADELMAN (176) de "corps acides" dans le sérum de sujets diabétiques gravement atteints. Ce même auteur décrivit le coma diabétique comme un coma acide (Säurekoma).

L'origine de la maladie n'est cependant pas connue et le rôle du pancréas non encore démontré. Dès la fin du XVIIIème siècle pourtant quelques cliniciens avaient noté que certaines formes destructives de pancréatites s'accompagnaient de diabète. Ces observations incitèrent quelques expérimentateurs à tenter l'ablation du pancréas chez l'animal dans le but d'apporter la confirmation d'une relation entre diabète et pancréas. L'échec de ces tentatives ne prouvait nullement que l'hypothèse était fausse mais plutôt que les techniques expérimentales n'étaient pas encore au point.

Ce n'est qu'en 1889 que Von MEHRING et MINKOWSKI (127) chirurgiens et expérimentateurs de premier ordre, réalisèrent une pancréatectomie vraiment totale chez le chien dans le but d'étudier l'effet de cet organe sur le mécanisme d'absorption intestinale des graisses. L'excellente connaissance que ces cliniciens avaient du diabète humain leur permit immédiatement de reconnaître l'apparition de ce syndrôme chez l'animal privé de son pancréas. Jusqu'ici seules les observations cliniques avaient orienté les expérimentateurs. A partir de 1889 ils cherchèrent plutôt à faire appel à de nouveaux

procédés physiologiques et biochimiques pour caractériser l'activité antidiabétique du pancréas. MINKOWSKI lui même remarqua ultérieurement que la seule ligature des canaux sécréteurs pancréatiques ne s'accompagnait pas de symptômes diabétiques, et formula l'hypothèse d'une fonction endocrine du pancréas. Quelques années plus tard en observant la très grande vascularisation d'un certain groupe de cellules, nommées Ilots de Langerhans en souvenir de l'histologiste qui les décrivit le premier en 1869, LAGUESSE(102) émit l'hypothèse d'une fonction endocrine localisée dans ces cellules.

Toutes ces données expérimentales amenèrent deux groupes de chercheurs, les canadiens BANTING et BEST (14) et le roumain PAULESCO (141', 141") à étudier l'effet d'extraits pancréatiques sur des chiens pancréatectomisés et obtinrent des résultats identiques presque à la même époque. BANTING et BEST ayant observé que les enzymes protéolytiques du pancréas détruisaient rapidement l'action antidiabétique des extraits d'organes, ces auteurs utilisèrent pour les préparer une nouvelle technique d'extraction à basse température. Les produits obtenus se montrèrent capables de diminuer la glycémie et de maintenir en vie les animaux pancréatectomisés. L'activité hormonale était ainsi démontrée. Par la suite ces mêmes chercheurs isolèrent la substance active qui reçut le nom "d'isletine", puis d'insuline, nom proposé par MEYER (130) en 1909.

C'est en 1922 que la première injection d'insuline bovine a été faite à un jeune homme atteint d'un coma diabétique jusqu'alors mortel. Une nette amélioration apparut. Pour la première fois, un traitement du diabète paraissait possible.

Pour les besoins cliniques, l'extraction de l'insuline fut rapidement réalisée à partir d'animaux différents, l'activité de l'hormone paraissant indépendante de l'espèce choisie. Plusieurs mammifères ont été utilisés, boeufs, chevaux, porcs, mais aussi des poissons tels la morue et la raie. La difficulté provenait surtout de la faible quantité d'insuline présente dans le pancréas et de sa sensibilité aux enzymes protéolytiques (25). Le procédé original de préparation fut amélioré par COLLIP (40) afin d'éliminer les protéines étrangères responsables d'accidents de sensibilisation.

A partir de cette préparation, ABEL (1) en 1926 obtient une insuline cristallisée qu'il décrit comme un produit pur de formule $C_{45}H_{69}O_{14}N_{11}S$, $3H_2O$, formule bien éloignée de la réalité ! Cette substance se révèle quatre à cinq fois plus active que l'insuline non cristallisée. Ce produit n'était vraisemblablement pas homogène, car, par précipitation avec l'acide flavianique, trois fractions différentes ont pu être isolées (108).

Etant donné la différence d'activité des préparations d'insuline selon leur provenance, un titrage physiologique a du être proposé par l'école canadienne :" l'unité TORONTO°". Elle avait été définie comme la quantité d'insuline qui, injectée par voie sous cutanée à un lapin de deux kg, à jeun depuis seize à vingt quatre heures, abaisse en quatre heures la glycémie de 1,10 à 0,45 g/litre. Pour les besoins cliniques on utilisait plutôt une unité "clinique TORONTO" égale au tiers de la précédente.

La généralisation de l'emploi de ces insulines en thérapeutique sembla apporter définitivement une solution au problème du diabète : il suffisait, d'après CHABANIER et LEBERT (34) d'injecter de l'insuline en quantité voulue, ceci pendant des cures de quinze à vingt jours suivies de périodes de repos où un régime très sévère devait être observé. L'injection était faite de préférence par voie sous-cutanée. En effet l'action de l'insuline se révèle ainsi plus intense et plus durable que par voie veineuse (AUBERTIN et CASTAGNOU) (10). Mais l'action fugace de l'insuline se révéla vite un handicap dans son utilisation. C'est pourquoi les insulines dites "retards" firent leur apparition.

° *Signalons que l'unité internationale en vigueur actuellement est représentée par 0,04086 mg de l'insuline étalon, déposé au Laboratoire National de la Santé Publique. Un milligramme de cet étalon correspond à 24,5 U.I. Les préparations les plus pures contiennent 27 U.I.*

La première fut celle proposée en 1936 par HAGEDORN (74) consistant en un mélange d'insuline bovine cristallisée et d'une protéine extraite de la laitance de poissons, la protamine. Plus tard SCOTT et FISHER (169) ayant remarqué que l'action de l'insuline cristallisée en présence d'ions zinc était plus durable que celle de l'insuline seule, mirent au point une association contenant de l'insuline, de la protamine, et des ions Zn^{++}. Chez le sujet diabétique, l'effet de cette préparation se produit six à huit heures après l'injection et se prolonge pendant vingt quatre heures environ°.

Cependant, malgré les résultats spectaculaires de ce traitement il fallut bien se rendre compte qu'il n'était pas parfait. En effet, chez des malades présentant un diabète de l'âge mûr, l'insulinothérapie ne se révèlait pas indispensable. L'autopsie de ces sujets révélait souvent une apparence normale des cellules β des Ilots de Langerhans. Il apparaissait donc que si le manque d'insuline était bien à la base de certains diabètes, tous les diabètes n'étaient pas pour autant dus à une insuffisance pancréatique. Si l'hyperglycémie et la glycosurie demeuraient les témoins les plus éloquents de la maladie, sa cause principale n'était plus recherchée au niveau du pancréas mais des tissus périphériques. Une meilleure connaissance des grandes unités métaboliques de l'organisme et des relations existant entre les diverses fonctions, amena dès 1930 HOUSSAY et ses collaborateurs (82) à mettre en évidence le rôle de l'hypophyse sur des animaux diabétiques puisque son ablation entraîne la diminution de l'hyperglycémie du chien pancréatectomisé. De même en 1937, YOUNG (205) montra que l'injection d'extraits hypophysaires à un chien produisait un diabète permanent.

° *Actuellement, il existe d'autres insulines retard obtenues par cristallisations d'insuline en présence d'ions zinc mais sans protamine. Des mélanges en proportions diverses d'insuline zinc amorphe et d'insuline zinc cristallisée ou d'insuline amorphe et d'insuline cristallisée permettent d'obtenir des préparations à action plus ou moins prolongée dans le temps.*

Pour tenter d'expliquer ces résultats un dosage de l'insuline pancréatique post mortem avait été réalisé par WRENSHALL (202). Cet auteur a montré que le pancréas de sujets jeunes arrivant au terme d'une longue période de maladie était souvent dépourvu de réserves insuliniques, tandis que celui de diabétiques du type adulte en contenait des valeurs normales ou même supranormales. Une simple déficience de la sécrétion insulinique ne pouvait donc constituer l'étiologie du diabète.

Le dosage de l'insuline circulante devait bouleverser encore les conceptions sur cette maladie. Ce dosage se révéla être d'une exceptionnelle difficulté en raison, d'une part de la faible quantité d'hormone présente dans le sang et, d'autre part, de la nature polypeptidique de l'insuline qui ne permettait pas la mise au point de réactions chimiques très spécifiques. Les premiers essais de dosage de l'insuline plasmatique furent des applications de la méthode biologique de GEMMILL (64) sur des hémidiaphragmes de rat. Les résultats furent décevants car très différents selon les auteurs. Le problème fut magistralement résolu par la mise au point du dosage radioimmunologique de l'hormone par YALOW et BERSON (203) que nous décrirons en détail page 48. Ces auteurs ouvrirent la voie à toutes les déterminations de "microquantités" de polypeptides dans les milieux biologiques. Il est à noter que ce dosage fut effectué pour la première fois en 1960, soit près de quarante ans après la découverte de l'insuline.

Confirmant les observations cliniques, les résultats des dosages ont permis d'affirmer la présence d'insuline en quantité normale dans le sang de malades dont le diabète est apparu tardivement. Ils ont également permis de révéler, dans les cas de diabète juvénile, une insulinémie normale à jeun, devenant anormale lors d'épreuve d'hyperglycémie provoquée (152). Des résultats analogues ont été obtenus par mesure de l'insulinémie chez des sujets ne présentant pas les symptômes classiques du diabète mais ayant dans leurs antécédents familiaux des diabétiques confirmés. Des études statistiques effectuées sur diverses populations mettent en évidence la transmission héréditaire (56). Lorsqu'elle existe, cette hérédité est de type récessif et ne conduit pas forcément à l'éclosion d'un diabète qui dépend de facteurs très complexes.

De nos jours, le diabète est considéré comme un désordre métabolique dont le mécanisme d'installation reste inconnu. Il est cependant établi que lorsque les premiers symptômes cliniques apparaissent, les altérations cellulaires sont déjà constituées et que seul un traitement palliatif peut être institué. Tout le problème actuel réside donc dans la prophylaxie de cette maladie, et surtout dans le dépistage de la période dite "prédiabétique". Elle est définie chez tout sujet, à antécédents familiaux diabétiques, comme la période s'étendant de la conception à la première manifestation clinique du diabète. La mise en évidence de cette période reste au premier plan des préoccupations des chercheurs et si l'utilisation de plus en plus fréquente d'épreuves dynamiques (hyperglycémie provoquée par voie orale ou veineuse, test à la tolbutamide) permet de déceler de plus en plus tôt une réponse anormale de l'organisme il n'en reste pas moins que tout le problème de la prévention du diabète repose sur la parfaite connaissance de la molécule d'insuline, de son mode d'action et de sa place dans la pathogénie de cette maladie.

° °

°

P R E M I E R E P A R T I E

CONNAISSANCES ACTUELLES

SUR L'INSULINE

C H A P I T R E I

LA MOLECULE D'INSULINE

Depuis sa découverte en 1921, l'insuline a fait l'objet de nombreux travaux et publications. Sa structure primaire n'a cependant été élucidée que depuis une quinzaine d'années et sa synthèse réalisée seulement depuis 1960 par plusieurs équipes de chercheurs. Les techniques de déterminations de très faibles quantités d'hormone, en particulier les méthodes utilisant des traceurs radioactifs ont permis de mieux étudier la biosynthèse de l'insuline et son transport dans l'organisme tout en précisant son activité biologique.

Il nous a semblé important de rassembler les connaissances les mieux établies que nous avons pu recueillir dans une très vaste bibliographie (plus de 1000 références citées seulement par le "Handbuch des Diabetes Mellitus").

I - STRUCTURE PRIMAIRE

Si sa nature polypeptidique a été rapidement mise en évidence dès 1928 par WINTERSTEINER et DU VIGNEAUD (198), la structure primaire complète de l'insuline n'a été dévoilée que vingt ans après. L'analyse de l'insuline, après hydrolyse totale, a été réalisée par plusieurs auteurs, qui ont utilisé la chromatographie sur colonne de MOORE et STEIN (133). Leurs résultats que nous avons reproduit sur le tableau I ont confirmé les travaux de CHIBNALL (38) qui, en 1942, avait montré que l'insuline contenait tous les acides aminés connus sauf deux : tryptophanne et méthionine°.
Il faut attendre cependant les remarquables travaux de SANGER (166) et de ses collaborateurs (1945 à 1955) pour établir la structure primaire complète de l'insuline de diverses espèces animales, mammifères en particulier. Ces études, qui valurent à SANGER le prix NOBEL en 1958 peuvent être schématisées de la façon suivante :

Développant sa méthode originale au dinitrofluorobenzène, SANGER a pu déterminer que le nombre de résidus N - terminaux du polypeptide était de quatre, soit, deux restes glycocolle et deux restes phénylalanine pour un peptide de poids moléculaire de 12 000, poids moléculaire déterminé en 1948 par GUTTFREUND (73). Pour cette raison, SANGER pensa que la molécule d'insuline était constituée de quatre chaines.

° *Depuis cette époque la méthionine a été trouvée dans un isomère de l'insuline de rat (voir page 20).*

TABLEAU I

COMPOSITION DE L'INSULINE BOVINE EN ACIDES AMINES

Acides aminés	Poids d'acides aminés pour 100g d'insuline. (en grammes)	Azote total (%)	Nombre de restes d'acides aminés pour 1 molécule d'insuline
Glycocolle	5,17	6,26	4
Alanine	4,59	4,67	3
Valine	9,65	7,49	5
Leucine	13,45	9,27	6
Isoleu.	1,51	1,04	1
Proline	2,13	1,69	1
Phénylala.	8,60	4,73	3
Cystine	12,18	9,22	3
Arginine	3,10	6,46	1
Histidine	5,41	9,50	2
Lysine	2,58	3,20	1
Ac. Aspart.	6,71	4,58	3
Ac. Glutam. } Glutamine	17,27	} 10,68	4 3
Sérine	5,28	4,57	3
Thréonine	2,00	1,53	1
Tyrosine	12,58	6,31	4

Un peu plus tard, HARFENIST et CRAIG (79) démontrèrent que le poids moléculaire réel de la molécule était voisin de 6000 (comme nous le verrons page 20) cela permit à SANGER d'affirmer qu'une molécule d'insuline était constituée de deux chaines.

En s'appuyant sur l'hypothèse de liaisons disulfures entre les chaines, SANGER a provoqué la rupture de ces ponts par une oxydation à l'aide d'acide performique. Chaque résidu de cystéine donnait un reste d'acide cystéique. La séparation des chaines a été réalisée par précipitation fractionnée. SANGER décrivit alors une chaine A contenant vingt et un résidus d'acides aminés avec le glycocolle en position N terminale et une chaine B plus complexe, contenant trente acides aminés avec la phénylalanine en position N terminale.

Par hydrolyse partielle acide des dérivés dinitrophénylés de la chaine A et de la chaine B, SANGER isola des peptides N terminaux grâce à leur solubilité dans les solvants organiques, solubilité conférée par des radicaux dinitrophénylés. L'analyse de ces peptides permit d'établir la séquence N terminale des deux chaines :

$^{+}(NH_3)$ Gly-Ileu-Val-Glu-Glu- Chaine A

$^{+}(NH_3)$ Phe-Val-Asp-Glu- Chaine B

SANGER et TUFFY (168) (1951) continuèrent l'établissement de la formule complète de la chaine B par l'analyse des peptides obtenus par hydrolyse partielle acide et surtout hydrolyse enzymatique. A l'occasion de ces travaux, les auteurs montrèrent l'importance du lieu d'action très spécifique de chaque enzyme protéolytique sur une chaine polypeptidique. Ils ont jeté les bases de nouvelles techniques analytiques en utilisant les enzymes dans l'étude structurale des protéines.

Deux ans plus tard SANGER et THOMPSON (167) établirent la structure de la chaine A de la même façon et déterminèrent la place de l'asparagine et de la glutamine. Ils complétèrent leurs travaux par la localisation des ponts disulfures : deux ponts reliant les chaines A et B et un pont interne reliant deux restes de cystéine de la chaine A.

Nous avons reproduit sur le tableau II la séquence désormais classique de l'insuline bovine :

TABLEAU II

STRUCTURE PRIMAIRE DE L'INSULINE BOVINE

	VARIATIONS AVEC L'ESPECE *(voir page 16)* CHAINE A	CHAINE A	CHAINE B	VARIATIONS AVEC L'ESPECE *(voir page 16)* CHAINE B
1		(NH_3^+) Gly	Phe (NH_3^+)	
2		Ile	Val	
3		Val	Asp (NH_2)	*Lys*
4	*Asp*	Glu	Glu (NH_2)	
5		(NH_2) Glu	His	
6		S—— Cys	Leu	
7		| Cys — S — S — Cys		
8	*Thr,*	| Ala	Gly	
9	*Gly,*	| Ser	Ser	
10	*Thr,Ile,*	| Val	His	
11		S—— Cys	Leu	
12		Ser	Val	
13		Leu	Glu	
14		Tyr	Ala	
15		(NH_2) Glu	Leu	
16		Leu	Tyr	
17		Glu	Leu	
18		(NH_2) Asp	Val	
19		Tyr	S — Cys	
20		Cys — S	Gly	
21		(NH_2) Asp	Glu	
22			Arg	
23			Gly	
24			Phe	
25			Phe	
26			Tyr	
27			Thr	
28			Pro	
29			Lys	*Met*
30			Ala	*Thr, Ser*

De la même façon, ces auteurs, suivis de beaucoup d'autres, déterminèrent dans les années qui suivirent la structure primaire des insulines de diverses espèces animales, et en particulier de l'insuline humaine, décrite en 1960 par NICOL et SMITH (138). L'analyse de ces diverses insulines a permis de caractériser de façon constante les seize acides aminés de l'insuline de boeuf, mais, selon l'espèce considérée, leur enchaînement varie. Faibles à l'intérieur du groupe des mammifères, les différences seraient plus importantes lorsqu'on passe à d'autres espèces animales, (poissons par exemple) (11). Chez le rat, SMITH (173) a également constaté l'existence de deux isomères possibles. Dans tous les cas, les variations portent en général sur les acides aminés 8, 9, 10° de la chaine A (partie comprise à l'intérieur du pont disulfure interne) et sur l'acide aminé 30 de la chaine B (tableau III).

TABLEAU III

VARIATIONS DES CHAINES SUIVANT LES ESPECES (149)

ESPECES	CHAINE A				CHAINE B		
	4	8	9	10	3	29	30
Boeuf	Glu	Ala	Ser	Val	Asp	Lys	Ala
Homme	Glu	Thr	Ser	Ile	Asp	Lys	Thr
Lapin	Glu	Thr	Ser	Ile	Asp	Lys	Ser
Baleine	Glu	Ala	Ser	Thr	Asp	Lys	Ala
Mouton	Glu	Ala	Gly	Val	Asp	Lys	Ala
Cheval	Glu	Thr	Gly	Ile	Asp	Lys	Ala
Porc	Glu	Thr	Ser	Ile	Asp	Lys	Ser
Rat-1	Asp	Thr	Ser	Ile	Lys	Lys	Ser
Rat-2	Asp	Thr	Ser	Ile	Lys	Met	Ser

° *Les acides aminés sont repérés suivant leur position dans la chaine, par leur numéro d'ordre à partir de l'acide aminé N terminal qui porte le numéro 1.*

II - STRUCTURE SECONDAIRE

Elle est définie comme la façon dont les acides aminés sont assemblés dans la chaine. Plusieurs hypothèses ont été avancées.

Pour CROWFOOT et OUGHTON (44) l'insuline possèderait une structure de β kératine. Cette théorie s'appuie sur l'étude cristallographique de petits peptides (cystine, diglycylcystine). Ceux-ci, comme les cristaux rhomboédriques d'insuline, présentent un double axe de symétrie. Pour ces auteurs, l'insuline possèderait une structure proche de celle décrite par PAULING et COREY pour les protéines β (142). D'après les études des cristaux, les deux chaines seraient distantes l'une de l'autre de 4,8 A° ce qui représente une valeur très voisine de la distance séparant deux chaines de protéines du type β soit 4,67 A°. Un argument est pourtant en désaccord avec cette théorie : la mesure des fréquences des liaisons CO et NH donne des résultats correspondants aux fréquences des protéines du type α.

LINDERSTRØM (113) émet une autre hypothèse en faisant appel à la structure en hélice proposée par PAULING et COREY (43), structure appliquée à la construction d'un modèle moléculaire par LINDLEY et ROLLET (115). Pour ces auteurs la chaine A est en hélice α gauche jusqu'au pont disulfure interne. A ce niveau, l'hélice change de sens pour devenir une hélice droite. La chaine B est parallèle à la première, en hélice α droite avec une seule distorsion au niveau de la proline près de l'extrémité terminale. Une structure légèrement différente a été proposée par LOW et EDSALL (119) qui donnent à la chaine B une hélice α gauche. Les résultats des travaux cristallographiques de CROWFOOT (45) ainsi que les résultats des réactions d'échange Hydrogène-deutérium (PRAISSMAN) (148), s'accordent mieux avec le modèle de LINDLEY (114). Les dernières études de MENENDEZ et HERSKOVITS (128) sur le dichroïsme circulaire et la dispersion optique rotatoire de l'insuline laissent supposer une structure comprenant 30 % d'hélice α, 15 % de structure β et 55 % de conformation indéterminée. De toutes façons, étant donnée la présence des deux ponts disulfures externes, du pont disulfure interne et de reste de proline, il semble bien que seuls de courts fragments de chaine (six ou huit acides aminés) puissent former une hélice dans les solvants favorables.

III - STRUCTURE TERTIAIRE

La disposition des chaines de l'insuline dans l'espace est encore mal connue malgré les très nombreuses études aux rayons X des cristaux rhomboédriques d'insuline-zinc (2) (500) et orthorhombiques de sulfate d'insuline (78). Les chaines polypeptidiques seraient accolées parallèlement à raison de six molécules par maille élémentaire soit douze chaines (78). Aucun résultat valable n'a encore été obtenu.

IV - STRUCTURE QUATERNAIRE

La difficulté rencontrée par de nombreux auteurs cherchant à déterminer le poids moléculaire de l'insuline et la multiplicité des résultats obtenus ont permis de mettre en évidence les possibilités d'association de la molécule d'insuline. Primitivement décrit à 48 000, le poids moléculaire a été ensuite fixé à 12.000 par GUTTFREUND (73). Puis grâce aux travaux de HARFENIST et CRAIG (79) utilisant leur méthode de distribution à contre courant il fut établi que la plus petite unité d'insuline correspondait à un poids moléculaire voisin de 6.000 (5707 pour l'insuline humaine). Ces sub-unités sont capables de se combiner fortement en dimères stables (PM = 12.000), en trimères et même tétramères. Ce phénomène a été bien étudié par FREDERICQ (60) et d'après lui, le degré d'association des unités monomères varie suivant les caractéristiques du milieu.

Comme tout équilibre physico-chimique, la dissociation est favorisée par une diminution de concentration et une élévation de température. Pour de fortes dilutions, il y a prédominance de petites unités, formes monomères ; il est possible que l'insuline agisse dans l'organisme sur les cellules vivantes sous cette forme qui facilite la diffusion. La dissociation est fonction de la charge des particules et par suite du pH de la solution : à pH très acide, la charge des particules est très élevée, la répulsion électrostatique maximum et la dissociation totale. Le poids moléculaire est alors faible. Lorsque le pH augmente, la charge des particules diminue et les forces d'attractions augmentent. Le poids moléculaire augmente et au delà d'un certain pH où il est égal à 36.000, l'aggrégation des particules est telle que l'insuline

précipite (pH4 à pH7). Au delà de pH7, en milieu alcalin, la charge des particules augmente et la dissociation redevient très élevée. Pour un pH supérieur à 10, la protéine est dénaturée. L'étude de la variation du poids moléculaire en fonction du pH a été étudiée et les résultats sont reproduits sur la figure 1.

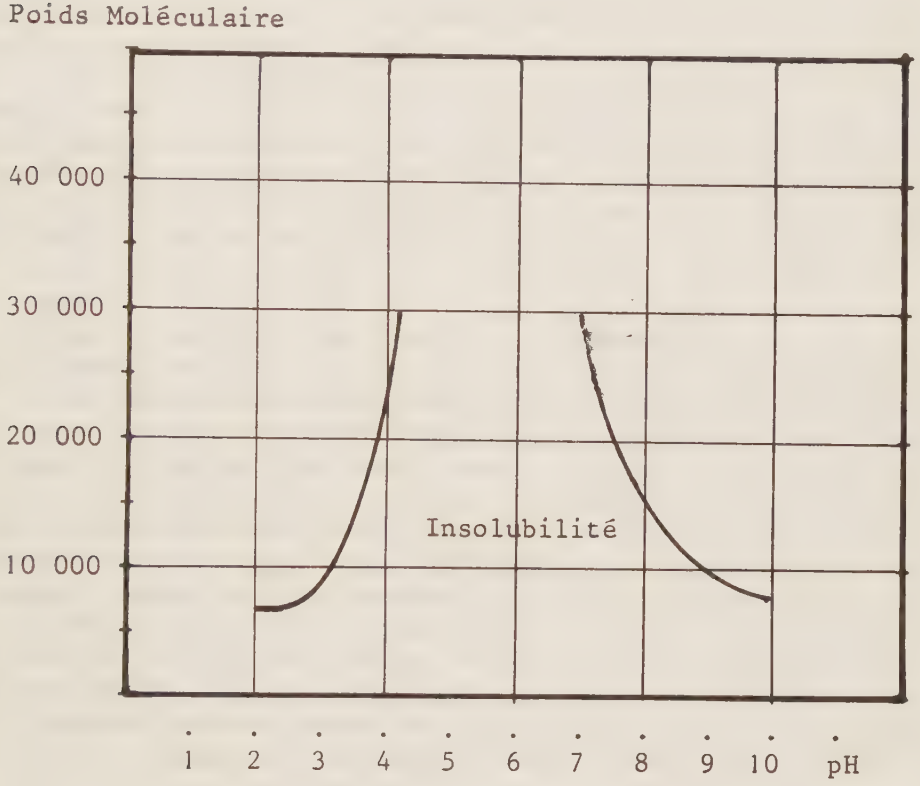


Figure 1 : Variation du poids moléculaire en fonction du pH

Les unités les plus petites couramment rencontrées correspondent à des dimères stables de poids moléculaire 12.000. Ce dimère forme l'unité du cristal de l'insuline en absence d'ions métalliques.

Une propriété caractéristique de l'insuline est la formation de fibrilles et sphérites. En effet, alors qu'à une température de 20°C, une solution d'insuline à pH 2 contient surtout des formes dimères, le chauffage à 80°C de cette solution provoque la formation d'aggrégats particuliers, de micelles qui se réunissent pour former des fibrilles. Leur largeur est d'environ 50 à 200 A° et leur longueur peut atteindre 20.000 A°. Elles ont, à l'opposé des systèmes d'association précédemment décrits, une remarquable stabilité de pH 0 à pH 10. La réaction peut même être induite à basse température par addition d'une fibrille à une solution d'insuline à pH acide.

WAUGH (191), étudiant la cinétique de cette formation suggère qu'une fibrille est amorcée par réaction de nucléation dans laquelle trois ou quatre unités dimères (PM = 12.000) s'unissent pour former une association stable. L'insuline, d'aprés WAUGH, garde dans la fibrille, sa structure moléculaire initiale. En effet, à pH voisin de 12, la fibrille se désagrège et donne de l'insuline identique à la molécule de départ. La formation de ces fibrilles est encore mal connue. D'après WAUGH, la liaison des molécules d'insuline serait en relation avec l'imbrication des chaines latérales des restes d'acides aminés. Les conditions de pH et de température, nécessaires à la formation de fibrilles, élimineraient l'hypothèse selon laquelle les forces de liaison seraient d'origine covalente, électrostatique ou hydrogène.

L'association de plusieurs molécules d'insuline est également influencée par la nature des ions en solution : en présence de zinc sous forme ionisée, l'insuline en solution devient insoluble et précipite sous forme cristalline par suite de l'association de deux, trois ou surtout six molécules d'insuline.

V - SYNTHESE

La molécule d'insuline a pris une telle importance sur le plan clinique qu'il était naturel que plusieurs équipes de chimistes essaient de réaliser sa synthèse. Trois groupes de chercheurs ont étudié simultanément ce problème, celui de ZAHN à Aix la Chapelle (209), de KATSOYANNIS à Pittsbourg (92) et de DU à Shangaï (51).

Les méthodes classiques de synthèse des polypeptides furent employées (90) :

1) la technique "par étapes" consiste à construire la chaine polypeptidique en fixant un par un les acides aminés qui la constituent, le point de départ étant en pratique l'acide aminé à groupement carboxylique libre plutôt que l'acide aminé à fonction aminée libre. Dans ce dernier cas, en effet, on assiste à une racémisation plus importante au cours de la synthèse. Le second acide aminé a son groupement aminé protégé par un radical N-benzyloxycarbonyle ou tertiobutoxycarbonyle. Son groupement carboxylique est activé sous forme d'ester paranitrophénylé et est condensé avec l'extrémité aminée du premier acide aminé dont le carboxyle est masqué. Le dipeptide obtenu, dont l'extrémité aminée est libérée par hydrolyse, devient ainsi le partenaire disponible pour une nouvelle étape. Entre chaque addition d'un nouvel acide aminé, la chaine est purifiée par cristallisations successives, par distribution à contre courant ou par chromatographie sur colonne. Les nombreuses manipulations nécessaires entrainent des pertes à chaque étape et la purification du polypeptide devient de plus en plus difficile lorsque le nombre d'acides aminés fixés augmente. Par suite le rendement de la synthèse diminue rapidement et cette technique, valable pour de petits peptides, est peu employée pour de grosses molécules.

2) La technique "par fragments" consiste en l'assemblage de petits peptides, tripeptides ou pentapeptides préparés par la méthode précédente. On peut éviter le phénomène de racémisation si l'on prend la précaution de préparer des peptides dont l'extrémité carboxylique est celle d'un acide aminé se racémisant peu ou pas du tout (proline ou glycocolle). Le rendement de la réaction est très faible et les réactions secondaires sont importantes, mais la pureté des produits obtenus et la relative facilité d'exécution de cette méthode la fait préférer à la précédente.

La première synthèse de la chaine A de l'insuline de mouton a été réalisée suivant cette dernière technique par l'école américaine avec KATSOYANNIS (93) en 1963. Ils ont utilisé des fragments de cinq à six unités. Cette chaine synthétique a été combinée avec une chaine naturelle et la molécule formée présentait l'activité de l'insuline naturelle. Simultanément en Allemagne et en Chine, les chaines A et B furent synthétisées et reliées entre elles. Le rendement extrêmement faible de la réaction (0,2 à 1 % d'insuline totale) permit cependant d'obtenir une insuline possèdant toutes les propriétés de l'insuline naturelle. Dans toutes ces préparations, la méthode utilisée pour relier les deux chaines par des ponts disulfures est celle employée par DU VIGNEAUD (187) pour la synthèse de l'ocytocine : les groupements thiols des molécules de cystéine sont protégés, pendant l'assemblage de la chaine, par un groupement benzylique ; ils sont libérés ultérieurement par action du sodium dans l'ammoniac liquide. L'oxydation à l'air des deux chaines permet la formation préférentielle des ponts disulfures de l'insuline naturelle.

Une amélioration considérable à cette technique fut apportée par MERRIFIELD (129) qui mit au point la synthèse peptidique en phase solide. C'est une synthèse "par étapes" qui utilise un artifice permettant de rendre insoluble le polypeptide en préparation : la chaine qui se forme est constamment reliée par une extrémité à un support solide insoluble, ce qui permet de réaliser facilement les lavages et les filtrations afin d'éliminer les produits parasites et les réactifs. Cela représente, pour un long peptide, un gain de temps considérable.

Le choix du support solide parmi les nombreux hauts polymères naturels ou de synthèse a été relativement simple en raison des propriétés exigées : le produit devait avoir une structure poreuse permettant une diffusion rapide des réactifs, il devait être stable chimiquement et physiquement dans les solvants utilisés et présenter des groupements fonctionnels permettant une liaison avec le premier acide aminé de la chaine. Le polymère du styrène condensé avec du divinylbenzène (1 à 2 % de ce dernier composé) se révèla un support de choix.

C'est une résine faiblement réticulée. Elle se présente sous forme de petites sphères de vingt à quatre vingt microns de diamètre qui gonflent très fortement dans les solvants non polaires en particulier le chlorure de méthylène. La présence des cycles aromatiques du styrène permet l'introduction de groupements fonctionnels chlorométhyl par substitution d'un hydrogène de chaque cycle. La fixation du premier acide aminé de la chaine peptidique se fait par l'intermédiaire de son groupement carboxyle avec une liaison benzylester, tandis que son groupement aminé est protégé sous forme butyloxycarbonylé. Par la suite cette fonction aminée peut entrer en réaction avec le carboxyle du deuxième acide aminé de la chaine. Pour augmenter le rendement de la réaction, les fonctions carboxyliques sont activées soit par la présence de N - N' dicyclohexylcarbodiimide soit surtout sous forme d'esters paranitrophénylés. Dans ce dernier cas, il y a moins de réactions secondaires et la protection des groupements fonctionnels des chaines latérales est moins nécessaire. Lorsque toute la chaine est synthétisée, le peptide est détaché de la résine par une hydrolyse à l'aide d'acide trifluoroacétique.

Cette technique présente beaucoup d'avantages sur les méthodes précédentes : facilité et rapidité de la synthèse, élimination simple des réactifs et des produits secondaires. Les chaines de l'insuline ont été synthétisées de cette façon par divers auteurs (208). Pour cela il a fallu environ cinq mille opérations distinctes, effectuées par une machine automatique sous contrôle d'un programmeur à tambour. Les réactions ont lieu dans un récipient unique. Le solvant et les réactifs sont ajoutés automatiquement à un moment donné, dans un ordre donné. Après mélange, ils sont laissés en contact pendant un temps déterminé. Les produits secondaires et l'excès de réactifs sont éliminés par action du vide à travers un verre fritté situé au fond du récipient. La résine et la chaine polypeptidique restent retenues. La fixation d'un acide aminé sur la chaine constitue un ensemble de réactions correspondant à un cycle de synthèse qui dure environ cinq heures. Le produit obtenu, après union des chaines A et B s'est révélé en tout points identique à l'insuline naturelle. Bien que le problème de la synthèse soit résolu, le faible rendement et la complexité des opérations ne permettent pas encore une utilisation commerciale du procédé.

Mais l'intérêt, et non le moindre, de cette synthèse réside dans la possibilité de fabriquer des molécules plus ou moins proches de l'insuline par modification de la séquence des acides aminés. L'étude ultérieure de l'activité biologique de ces molécules peut aider à préciser le mode d'action de l'insuline elle même. C'est ce travail qui est entrepris actuellement et nous le verrons plus en détail dans le troisième chapitre.

° ° °

CHAPITRE II

METABOLISME DE L'INSULINE

I - BIOSYNTHESE

La biosynthèse de l'insuline dans les cellules des Ilots de Langerhans s'effectue suivant le schéma désormais classique de la formation des protéines mais la façon dont les chaînes sont combinées in vivo est restée longtemps sans réponse. L'existence d'un précurseur à l'insuline dans le pancréas est pressentie depuis longtemps puisque AUBERTIN (8) parle "d'insulinogène" au même titre que du trypsinogène, précurseur de la trypsine. De plus la présence en grande quantité dans le pancréas d'une part d'ions zinc, d'autre part de protéines riches en acides aminés basiques et soufrés telles les histones a fait envisager des associations avec l'insuline. Cela fut confirmé par LINDNER (116) en 1940 qui réussit à isoler, du pancréas de boeuf, une insuline associée avec une histone de petit poids moléculaire. Cet auteur appela ce complexe : "insuline native".

Deux hypothèses se sont opposées, quant à la nature même du produit synthétisé. La première (83) décrivait la formation indépendante des deux chaines réunies ultérieurement par une oxydation permettant l'établissement des ponts disulfures, LAZAROW (107) a suggéré que les deux chaines pouvaient être réunies par un enzyme qu'il appelle "Zipase". DIXON et WARDLAW (48) ont montré que cette union pouvait avoir lieu in vivo, bien qu'avec un très faible rendement et qu'un enzyme tel que la glutathion transhydrogénase pouvait jouer un rôle très actif. La deuxième hypothèse suggérait la biosynthèse d'un précurseur polypeptidique converti ultérieurement en insuline par un mécanisme de protéolyse (WANG et CARPENTER) (189).

La richesse en groupements disulfures des enzymes du pancréas exocrine, semblable à celle de l'insuline, laisse en effet supposer une même synthèse pour l'hormone et les enzymes pancréatiques. WANG parvient même à isoler dans les cellules β des îlots de Langerhans une substance qui n'est pas de l'insuline (9).

Les travaux de STEINER (178) et de ses collaborateurs ont depuis 1967 abouti à la démonstration puis à l'isolement de ce précurseur : la *proinsuline*. Ces chercheurs mirent à incuber des fragments d'adénômes d'ilôts de Langerhans avec des acides aminés marqués isotopiquement et trouvèrent, en plus de l'insuline marquée et de protéines non identifiées, une protéine marquée, plus grande que l'insuline, mais proche immunologiquement et chimiquement. Au même moment CHANCE et ELLIS (36) par chromatographie sur colonne de cellulose isolèrent un composant mineur des préparations d'insuline cristallisée (1 % des protéines totales) qui se révèla identique à la proinsuline de STEINER.
L'étude de ce polypeptide a conduit à établir sa structure. Il a un poids moléculaire voisin de 9 000 (179). L'analyse complète a permis de reconnaître les deux chaines de l'insuline reliées entre elles par leurs ponts disulfures et un peptide connecteur ou peptide C placé entre l'acide aminé numéro un de la chaine A (glycocolle) et le numéro trente de la chaine B (alanine pour le porc). Sa composition en acides aminés varie suivant les espèces. Une proinsuline de boeuf, de porc et même, deux variétés de proinsuline de rat ont été isolées (37) (39). Cependant les deux extrémités du peptide sont identiques, quelle que soit l'espèce : acide glutamique - lysine - arginine pour l'extrémité reliée à la chaine A, acide glutamique - arginine pour l'extrémité reliée à la chaine B. Nous avons reproduit sur la figure 2 le schéma de la structure primaire de la proinsuline de porc.

La proinsuline ne possède pas les propriétés biologiques de l'insuline si ce n'est à dose très forte et in vitro. Son titre, exprimé en unités internationales d'insuline, est de l'ordre de 2 à 3 unités par mg. Une action insulinique a été démontrée in vitro mais on peut penser que cet effet n'est pas lié à la proinsuline elle même mais à sa transformation en insuline sous l'influence d'enzymes protéolytiques présents dans les cellules (9).

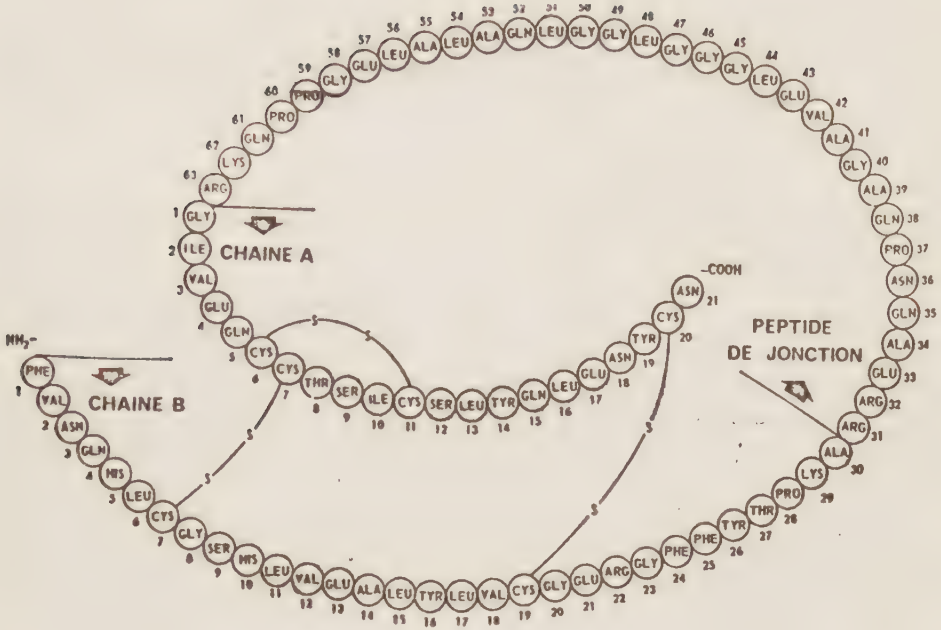


Figure 2 - Structure primaire de la proinsuline de porc

D'après STEINER la proinsuline, synthétisée sur les ribosomes du réticulum endoplasmique, est transformée, avant d'être gardée dans le granule de sécrétion, sous forme d'insuline. A la lumière de travaux similaires, GRANT et REID (66), en 1968, en incorporant de la proline marquée à des ilôts de Langerhans isolés, observèrent la formation d'un polypeptide à une chaine ayant un poids moléculaire voisin de 10.000. Au bout d'une heure, ils notent une augmentation de la radioactivité de l'insuline. Les observations de SORENSON, STEFFER (175) permettent de suivre la synthèse de l'insuline à partir d'Ilôts de Langerhans de rat, marqués au tritium. L'examen est effectué sur des tranches de ce tissu prélevées à divers moments.

D'après les résultats, la synthèse de la proinsuline est réalisée dans la fraction microsomiale, puis il y a transfert au granule de sécrétion où se fait la conversion. La durée des diverses opérations a pu être mesurée : le transfert de la proinsuline au granule de sécrétion en insuline est de quarante minutes.

II - SECRETION

Lors de la sécrétion, les granules de sécrétions migrent vers la membrane de la cellule pancréatique. Les membranes fusionnent et le granule déverse son contenu dans le milieu extracellulaire (101). L'insuline est donc libérée dans la veine pancréatique puis portale et, après passage à travers le foie, apparait dans la circulation générale. La sécrétion est permanente mais est influençée par divers facteurs. Elle est essentiellement sous la dépendance du taux de glucose présent. GRODSKY (70) a noté que l'addition de glucose à un liquide de perfusion d'un pancréas produisait une libération immédiate d'insuline dans le milieu. Le taux de la glycémie a été tenu responsable de la régulation de la sécrétion. Actuellement cette conception est rejetée par certains auteurs. En particulier COORE (41) a montré que le 2 desoxyglucose, capable de provoquer une hyperglycémie, s'avère incapable d'agir sur la sécrétion d'insuline et même inhibe l'action stimulante du glucose. Cet auteur pense que la phosphorylation du glucose est nécessaire, or GRODSKY montre que le glucose-6-phosphate n'augmente pas la sécrétion insulinique. Cette phosphorylation, si elle intervient, se ferait donc au niveau pancréatique. Le mécanisme de cette réaction reste inconnu. D'autres expériences montrent que l'insuline est libérée en plus grande quantité lorsque le glucose est absorbé par voie digestive et l'hypothèse d'une action stimulante de la sécrétine et de la pancréatozymine est avancée (53). D'autres substances sont capables de provoquer une sécrétion insulinique : glucagon et substances hypoglycémiantes tel le tolbutamide l'ouabaïne (117) et les corticostéroides. Au contraire l'adrenaline et l'alloxane sont les inhibiteurs de cette sécrétion (146).

III - TRANSPORT

L'étude des formes circulantes de l'insuline dans le plasma a soulevé de nombreuses controverses et le problème n'est pas encore résolu.

Pour ANTONIADES (5) l'insuline existe sous deux formes : une libre "free" l'autre liée "bound". La première se comporte du point de vue chimique et biologique comme l'insuline cristallisée pancréatique. Elle migre en électrophorèse sur papier à pH 8,2, au niveau des fractions alpha-globulines et albumine. La seconde, insuline "liée", migre au niveau des béta et gamma globulines. Ces deux formes peuvent être séparées par fractionnement du sérum sur une résine échangeuse de cations (4) (DOWEX par exemple). L'insuline "libre" n'est pas retenue sur la colonne tandis que l'insuline "liée" reste fixée et n'est éluée que par un tampon très alcalin. Cela tendrait à prouver l'association de l'insuline avec une protéine à charge positive, riche en acides aminés basiques (143). Le complexe peut être dissocié par incubation avec un extrait de tissu adipeux ou une solution alcaline.

SAAMAN et FRASER (163) décrivent également deux formes d'insuline circulante qu'ils appellent "typique" et "atypique". Ces formes sont très voisines des précédentes. Cependant l'insuline "atypique" n'est pas identique à l'insuline "liée" d'ANTONIADES car, après surcharge glucosée, cette dernière disparait du sérum tandis que la première subsiste. BERSON et YALOW (20) critiquent ces théories et d'après eux la forme "liée" et la forme "atypique" ne correspondent pas à de l'insuline vraie. En 1969 GORDEN et ROTH (65) décrivent deux composés insuliniques : un composé principal "little" identique à l'insuline pancréatique et un composé "big" proche de la proinsuline, beaucoup plus abondant chez les sujets à diabète non consomptif.

Les diverses formes de l'insuline décrites dans le plasma ne permettent pas actuellement de définir exactement la nature de l'insuline circulante (11). Le problème se complique encore par l'étude de la réactivité de l'insuline plasmatique avec les anticorps antiinsuline. Deux formes d'insuline sont alors décrites : insuline "supprimable" et insuline "non supprimable" que nous envisagerons plus en détail page 47.

L'insuline libre ne persiste pas longtemps dans le sang. L'étude de sa disparition faite par BERSON et YALOW (21) à l'aide d'insuline marquée isotopiquement a montré que cinq minutes après injection d'insuline marquée à un animal, on ne retrouve plus celle-ci dans le sang. Cette disparition est due d'une part à la dilution de l'hormone dans un grand volume, d'autre part au phénomène de dégradation qui métabolise, chez l'homme, environ 2 % du taux de l'insuline circulante. Cette protéine a une demi-vie de l'ordre de vingt cinq minutes.

IV - DEGRADATION

L'insuline, sécrétée par le pancréas est déversée dans la veine porte et amenée au foie. MADISON et ses collaborateurs (124) ont montré que ce tissu retient environ la moitié de l'hormone qui le traverse. Une partie de l'insuline fixée est détruite.

La dégradation de l'insuline est réalisée dans les divers tissus par les enzymes protéolytiques et surtout par un enzyme spécifique : l'insulinase qui est le plus puissant inhibiteur de l'insuline. Son existence a été démontrée dès 1945 par MIRSKY (132). Il a noté sa présence dans le foie, le rein, le pancréas en particulier mais non dans le plasma. L'insulinase est contenue dans la partie soluble des homogénats de tissus. Son activité est maxima à pH légèrement alcalin. Elle agit par inactivation des liaisons disulfure de l'insuline avec dégradation de la molécule. La présence de glutathion est nécessaire d'où le nom de glutathion - insuline transhydrogénase donné à cet enzyme qui agit aussi sur la vasopressine et l'ocytocine (62).

MIRSKY a également identifié la présence, dans le foie et d'autres tissus, rein en particulier, d'un inhibiteur de l'insulinase de nature peptidique. L'activité insulinique résulte donc de l'équilibre entre les deux systèmes : activateur et inhibiteur (131). La rupture de cet équilibre pourrait entrainer une modification de l'action hormonale mais jusqu'à présent rien ne permet de dire que le diabète résulte d'une augmentation d'activité de l'insulinase.

Le résultat du catabolisme de l'insuline n'est pas le même dans tous les tissus. Si le tissu hépatique rejette la chaîne A entière, le tissu adipeux où l'action est plus rapide ne libère que des fragments de cette chaine. Il semble bien que chaque tissu possède son système enzymatique particulier.

L'excrétion urinaire de l'insuline est assez faible chez l'homme, de l'ordre de 3 à 18 mU par jour (environ 0,5 µg). Le mécanisme en a été étudié par CHAMBERLAIN et STIMLER (35) : l'insuline, filtrée au niveau glomérulaire est presque complètement réabsorbée ou détruite au niveau des tubules dont les cellules sont riches en insulinase.

° ° °

CHAPITRE III

PROPRIETES DE L'INSULINE

Dès son isolement en 1921, l'insuline a été synonyme d'hormone hypoglycémiante. Une série d'articles parus en 1923 a démontré que l'injection d'une petite quantité d'insuline à n'importe quel animal entraine une diminution de sa glycémie°. Ce phénomène a été mieux observé lorsque l'on a utilisé des animaux rendus diabétiques par injection d'hormones anté-hypophysaires ou surrénaliennes et même, par destruction du pancréas endocrine par l'alloxane (29). L'étude de l'activité insulinique n'est cependant pas facile in vivo en raison de la complexité des fonctions métaboliques et de l'intervention des autres hormones, qui, agissant de façon semblable ou opposée à l'insuline, modifient les résultats. Le développement d'expériences sur les organes isolés maintenus en survie, l'utilisation de techniques de marquage radioisotopique ont permis de préciser le rôle de cette hormone. De nombreux essais ont été pratiqués sur les tissus isolés, tissu musculaire (coeur ou diaphragme) et surtout tissu adipeux, principal lieu du métabolisme intermédiaire (155). Considéré pendant longtemps comme métaboliquement inerte, ce tissu est depuis une vingtaine d'années reconnu comme un véritable organe, siège des réactions enzymatiques des divers métabolismes. Il possède un rôle de réserve lipidique mais aussi de réserve d'énergie par sa grande concentration en triglycérides. Les cellules adipeuses réalisent l'oxydation du glucose et la synthèse protéique. Les expériences portant sur l'incubation, en présence d'insuline, de tissu adipeux prélevé au niveau de la graisse sous-scapulaire et épididymaire du rat révèlent une sensibilité particulière de ce tissu à l'hormone (121).

° *Signalons qu'un tel essai est toujours utilisé pour la détermination du nombre d'unités internationales d'une préparation insulinique (Codex).*

Les effets insuliniques ont pu être bien étudiés et, actuellement, à la définition d'hormone hypoglycémiante, on tend à substituer la notion d'une substance agissant au niveau cellulaire sur le métabolisme des "lipides", des "protides", et surtout des "oses". Nous envisagerons successivement ces trois aspects :

I - ACTION SUR LES LIPIDES

Les troubles du métabolisme des lipides au cours du diabète sont connus de longue date, puisqu'il est classique d'opposer les diabètes "gras" et les diabètes "maigres" et qu'une caractéristique de l'animal diabétique est son incapacité à synthétiser les acides gras et à stocker les "sucres" sous forme de graisse.

Le taux élevé des acides gras libres et du glycérol dans le sérum de sujets diabétiques a été constaté depuis longtemps (26, 75) et l'hypothèse d'une action de l'insuline sur le transport de ces acides a été émise. Diverses expériences ont permis de montrer que l'insuline favorise la pénétration des acides gras dans les cellules hépatiques et adipeuses surtout (27). La diminution du taux d'acides gras libres du sérum sous l'effet de l'insuline s'explique essentiellement par l'action antilipolytique de l'hormone c'est à dire une diminution de l'hydrolyse des triglycérides du tissu adipeux. L'étude faite par JUNGAS et BALL (91) sur des cellules adipeuses isolées a permis de démontrer qu'une faible quantité d'hormone est capable de diminuer de façon importante la libération des acides gras et du glycérol dans le milieu extracellulaire, cette action étant indépendante du taux de glucose dans le milieu. L'insuline s'oppose à l'action d'hormones lipolytiques : adrénaline, hydrocortisone et glucagon par exemple.

L'insuline agit également en favorisant la synthèse des acides gras mais ce phénomène est dépendant de la présence de glucose dans le milieu et doit être considéré comme une conséquence de l'action insulinique sur le métabolisme des glucides et sera envisagé ultérieurement.

II - ACTION SUR LES PROTIDES

Les premières observations de Von MEHRING et Coll. (127) ont montré que l'ablation du pancréas entrainait, outre un effet hypoglycémiant, une diminution de l'azotémie et une fonte tissulaire. Cependant, chez les animaux normaux, l'administration d'insuline, si elle entraine une chute du taux d'acides aminés dans le sang n'amène aucune modification de l'équilibre azoté (122). Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'insuline possède un effet anabolisant qui peut être masqué par l'action catabolisante de certains corticoïdes dont la sécrétion est déclanchée par l'hypoglycémie.

L'insuline agit en premier lieu sur la pénétration des acides aminés dans les cellules. Cette propriété a été mise en évidence par plusieurs expériences sur le tissu cardiaque, (200) hépatique (67), sur le diaphragme (125) (199) et sur le tissu adipeux (98). KRAHL et MANCHESTER (99) ont montré que cet effet se produit pour de faibles quantités d'insuline et qu'il est indépendant de la présence de glucose dans le milieu. La stimulation de la biosynthèse protéique, vérifiée par des techniques de marquage isotopique parait être une conséquence de la propriété précédente. Il y a en plus une action particulière de l'insuline au niveau de l'ARN messager d'après KORNER (97) ou plutôt au niveau de la structure directe des ribosomes d'après WOOL, RAMPERSAD et MEYER (201).

III - ACTION SUR LES OSES

C'est au niveau des oses en général, et du glucose en particulier que se situe la principale action de l'insuline. Depuis les premiers travaux de LATCHFORD et HEPBURN (106) sur le coeur de lapin isolé et de BEST et DALE (24) sur les muscles du chat, de nombreux auteurs ont réalisé des expériences portant sur le diaphragme (64), le muscle squelettique (196), le foie (124) et le tissu adipeux (197). Tous les résultats concordent : l'insuline favorise le passage du glucose et de la plupart des oses dans l'espace intracellulaire et de cette façon, diminue leur taux dans le sang. Que deviennent ces oses dans les cellules ?

La plupart d'entre eux, sucres utilisables par l'organisme, ne s'accumulent pas et sont oxydés. Leur métabolisme dépend un peu de la nature et de la fonction des tissus considérés. Pour son utilisation, le glucose doit être phosphorilé sous forme de glucose 6 phosphate, réaction catalysée au niveau du muscle par l'hexokinase, au niveau du foie par la glucokinase. Dans le tissu musculaire la dégradation de ce composé peut suivre la voie des hexoses phosphates et, par l'intermédiaire du Cycle de Krebs, fournir de l'énergie. L'insuline stimule également la production de glycogène, nécessaire à la contraction musculaire. Son action se situe au niveau de la glycogène synthétase dont elle favorise la déphosphorilation (105). La formation de glycogène intéresse également le tissu hépatique mais, dans ce dernier cas, les effets de l'insuline sont très difficiles à mettre en évidence en raison de la complexité des fonctions hépatiques et certains auteurs nient même toute action de cette hormone au niveau du foie (57). Il semble pourtant actuellement que le résultat de l'activité insulinique soit une diminution du taux de glucose libéré dans le sang. L'utilisation du glucose dans le tissu adipeux est très importante puisque environ 30 % du glucose circulant est métabolisé dans ce tissu. La voie des hexoses phosphates et des trioses-phosphates fournit de la dihydroxyacétone génératrice d'α glycérophosphate et de l'acétyl coenzyme A, nécessaires pour la lipogénèse. Une autre voie du métabolisme du glucose est primordiale dans le tissu adipeux, il s'agit de la voie des pentoses, favorisée par l'insuline comme en témoigne la grande production de gaz carbonique lors de l'incubation de cellules adipeuses avec du glucose et de l'insuline. Il y a surtout formation de $NADPH^+$, indispensable à la synthèse d'acides gras à longue chaine. La lipogénèse est donc favorisée par l'insuline puisque tous les éléments sont apportés en grande quantité : acétyl-coenzyme A, malonyl-coenzyme A, acide citrique, NADPH. Les acides gras formés servent à la synthèse de triglycérides par estérification avec l'α glycérophosphate. Les expériences de marquage isotopique confirment l'augmentation du taux de triglycérides du tissu adipeux à partir de glucose marqué au carbone 14.

A ces propriétés de l'insuline, il convient d'ajouter son action sur les mouvements des électrolytes (3). La diminution de la kaliémie à la suite d'injection d'insuline a été souvent remarquée. ZIERLER (200) l'a bien étudiée, et d'après cet auteur, l'insuline augmente d'une part le potentiel électrique de la membrane cellulaire au repos, d'autre part l'entrée des ions potassium dans la cellule. Elle augmente la concentration intracellulaire de ces ions en empêchant leur sortie. Parallèlement une action inverse s'exerce au niveau des ions sodium.

IV - PROPRIETES ANTIGENIQUES

Dès le début des traitements insuliniques, certains incidents ont attiré l'attention des chercheurs. Ainsi l'apparition de manifestations d'allergie cutanée du type urticaire lors de l'injection de l'insuline a fait mettre en doute la pureté des préparations d'insuline. L'utilisation d'hormone hautement purifiée et plusieurs fois recristallisée (dix à douze fois) (139) a supprimé cette cause et a fait diminuer le nombre de ces réactions sans pourtant les réduire tout à fait. L'hormone elle même devait être mise en cause. De plus, des phénomènes de résistance au traitement insulinique se sont développés chez des sujets traités depuis plus de six semaines à l'insuline. Ces observations ont laissé supposer la présence, dans le sérum de ces sujets, d'anticorps s'opposant à l'action de l'insuline. Dès 1938, BANTING (14) et ses collaborateurs ont constaté que l'injection du sérum d'un schizophrène non diabétique, mais ayant subi une cure par chocs insuliniques, protégeait la souris contre une dose mortelle de cette hormone. Ces résultats furent confirmés par YALOW et BERSON (204) qui montrèrent la persistance de l'insuline marquée à l'iode 131 dans le sérum de sujets résistants au traitement.

On admet actuellement l'existence de deux sortes d'anticorps à l'antigène insuline, qui ne coexistent pas forcément chez le même sujet (6).

Les premiers sont responsables de réactions locales au point d'injection, érythème, urticaire et très rarement réactions générales. Ils sont du type "Réagines" (120)

et peuvent être mis en évidence par des tests cutanés. Ils sont thermolabiles et migrent avec les β globulines au cours de l'électrophorèse. Il existe une véritable hypersensibilité à l'insuline qui ne relève pas d'un facteur spécifique propre à l'espèce : en effet certains sujets présentant une réaction vis à vis de l'insuline d'une espèce animale ne réagissent pas avec d'autres protéines de la même espèce (HARTEN) (81).

Les seconds sont du type "bloquant", fixant ou neutralisant de LOVELESS (118). Ils sont thermostables, non dialysables, migrent en électrophorèse avec les globulines β et γ surtout et existeraient chez tout sujet ayant reçu un traitement insulinique pendant six semaines. Leur isolement réalisé à partir du sérum d'animaux "immunisés" est très difficile car tous les essais de précipitation ont été négatifs. Le procédé mis au point par GRODSKY et FORSHAM (71) et repris par YALOW et BERSON a permis une étude de ces anticorps : une injection d'insuline marquée à l'iode 131 est faite à un animal ou à un sujet immunisé par traitement antérieur à l'insuline. L'électrophorèse du sérum est faite et l'insuline marquée se retrouve en partie au niveau des anticorps, c'est à dire sur les gamma-globulines.

La cinétique de la réaction antigène insuline-anticorps a été bien étudiée par BERSON et YALOW (18). Le complexe Anticorps-Antigène ne précipite pas quelle que soit la concentration de l'un ou de l'autre. La réaction est une réaction d'équilibre du type :

$$Ag + Ac \rightleftarrows (Ag - Ac)$$

L'équilibre obéit à la loi d'action de masse et pour une concentration d'anticorps constante le rapport de l'insuline présente dans le complexe à l'insuline libre est une fonction inverse de la quantité d'insuline totale. Les résultats des travaux actuels semblent prouver que l'antigène insuline est univalent et qu'il existe deux ordres distincts de sites fixant sur les anticorps, l'affinité de chacun d'eux variant avec la provenance de l'insuline. La spécificité des anticorps vis à vis de l'insuline dépend de l'espèce. En effet le sérum d'un sujet immunisé par une insuline de boeuf réagit avec toutes les insulines animales

que ce soit celle de porc ou de mouton. La fixation Antigène-Anticorps n'est cependant pas toujours aussi forte (19). Le calcul des énergies de liaison des divers complexes Antigène-Anticorps obtenus par action d'anticorps humains anti-insuline de boeuf et d'antigènes de nature différente : cheval, porc, boeuf, a permis de démontrer que les insulines de cheval et de boeuf étaient fixés plus fortement que celle de porc. La liaison la plus forte concerne l'antigène et l'anticorps de la même espèce. Ces insulines ne diffèrant entre elles que par la séquence 7-8-9 de la chaine A il semble bien que ces acides aminés jouent un rôle dans la détermination du pouvoir antigénique (149).

Chez les sujets présentant une résistance à l'insuline de boeuf, le traitement à l'insuline de porc donne de bons résultats. Cette dernière ne diffère de l'insuline humaine que par le dernier acide aminé terminal de la chaine B. Celui-ci ne paraît donc pas jouer un rôle important dans la détermination du pouvoir antigénique.

C H A P I T R E I V

DOSAGE DE L'INSULINE

Étant donné la quantité importante d'insuline stockée dans le pancréas, il était évidemment plus facile d'aborder en premier lieu le problème du dosage de l'insuline pancréatique. Dans ce cas, les méthodes chimiques de dosage de l'insuline peuvent convenir. Nous citerons la méthode adaptée par GRODSKY (69) utilisant la formation de fibrilles par chauffage d'une solution acide d'insuline. Le trouble de la solution est apprécié néphélométriquement ou bien le précipité recueilli est dosé gravimétriquement. ROBINSON et FEHR (158) utilisent une chromatographie sur papier pour isoler l'insuline. Les spots d'insuline colorés avec du vert de bromocrésol sont élués et la solution permet une mesure colorimétrique. Ces méthodes ne sont valables que pour des concentrations d'au moins 100 microgrammes d'insuline par gramme de tissu.

La mesure de l'insulinémie présente de très grandes difficultés. Il s'agit en effet de doser une quantité de l'ordre du microgramme d'un peptide, dans une solution aqueuse contenant des protéines, a une concentration dix millions de fois supérieure (1/10 ppm). Nous comprenons pourquoi pendant de nombreuses années, faute de méthodes assez sensibles et spécifiques pour la doser, l'insuline plasmatique n'a été étudiée que par des mesures indirectes de la glycémie et de la glycosurie.

Depuis une quinzaine d'années, deux grands groupes de méthodes, toutes imparfaites, ont été proposées pour doser l'insulinémie. On distingue :

- les méthodes faisant appel aux propriétés biologiques de l'insuline,

- les méthodes faisant appel aux propriétés antigéniques de l'insuline, méthodes immunologiques.

Nous allons résumer brièvement chacune d'elles en notant bien toutefois que toutes ces techniques dosent "une activité insulinique" et non l'insuline en temps que molécule.

I - METHODES BIOLOGIQUES

Les premières utilisaient l'action hypoglycémiante de l'hormone. Dès 1930, BRUGSCH et HOSTER (30) essaient de doser l'insulinémie à l'aide du test des convulsions de la souris. La sensibilité étant très faible, aucun résultat ne put être obtenu. l'emploi d'animaux privés de leur hypophyse, de leur surrénales ou rendus diabétiques par injection d'alloxanne (123) permit d'améliorer la sensibilité de ces méthodes qui resta cependant supérieure à 100 µU d'insuline par ml et pu même atteindre 1000 µU par ml. Les faibles quantités d'insuline présentes dans le sang ne pouvaient être ainsi dosées. Une technique donne de meilleurs résultats, celle de BORNSTEIN (20) en 1950, dont la sensibilité atteint 50 µU par ml. Cependant, les méthodes "in vivo" ne se répandirent guère en raison de l'extrême difficulté des opérations préliminaires.

Bien plus employées sont les méthodes dites "in vitro" qui utilisent les propriétés biologiques de l'insuline vis à vis des organes isolés. Le critère d'action insulinique le plus employé concerne le métabolisme du glucose dans les tissus musculaire et adipeux. L'insuline présente dans l'échantillon de sérum à doser peut être déterminée en mesurant la diminution du glucose extracellulaire avant et après incubation d'un système tissu - glucose - insuline : les tissus les plus employés sont le diaphragme (184) (190) ou le tissu adipeux (17) (110) (156). La production de glycogène à partir du glucose a été mesurée sur l'hémidiaphragme (88) mais bien que sensible cette méthode n'a pas été retenue car elle nécessite un isolement préalable du glycogène. Les seules méthodes utilisées plus couramment font appel soit à la mesure manométrique de la production nette de gaz par oxydation du glucose dans le tissu adipeux, l'augmentation du

gaz carbonique dégagé étant bien supérieure à la consommation d'oxygène par le tissu (13) ; soit surtout à l'utilisation de substrats marqués isotopiquement : l'accroisement du gaz carbonique produit à partir du glucose marqué $^{14}C_1$ est mesuré par la détermination de la radioactivité du gaz carbonique collecté à la fin de l'incubation. Cette technique développée par MARTIN, DAGENAIS et RENOLD (126) est de loin la plus sensible de toutes les méthodes précédentes (sensibilité de l'ordre de 100 µU/ml).

Quel que soit le système biologique utilisé, ces méthodes ont toutes pour principe de comparer l'effet biologique d'un échantillon de plasma avec l'effet de solutions étalons d'insuline. Mais il est bien évident que dans le sérum existent des substances à effet insulinique et d'autres à action antagoniste. Les méthodes précédentes mesurent donc une résultante entre ces deux effets opposés, et au lieu de parler d'insulinémie, il faut employer le terme introduit par RENOLD : ILA (insulin-like activity). Les taux d'ILA trouvés dans le sérum de sujets normaux à jeûn se situent de 50 à 1000 µU/ml pour les techniques s'adressant au diaphragme et de 30 à 1000 µU/ml pour les méthodes utilisant le tissu adipeux (171). Il est intéressant de noter les travaux de FROESCH (61) et ceux de SAMAAN (164) qui ont employé les méthodes de dosage précédentes sur le tissu adipeux et sur le diaphragme, en ajoutant au milieu d'incubation du sérum anti-insuline. L'activité insulinique mesurée par la méthode utilisant le diaphragme est entièrement supprimée par adjonction d'anticorps antiinsuline. Pour les techniques employant le tissu adipeux, l'activité insulinique mesurée sur les solutions standards, contenant de l'insuline pancréatique, est entièrement supprimée tandis que l'activité mesurée sur des sérums est seulement diminuée par addition d'anticorps. La partie supprimée est appelée par SAMAAN activité insulinique "typique" et par FROESCH activité insulinique "supprimable" ou SILA (Suppressible insulin like activity). L'activité restante devient activité insulinique "atypique" ou "non supprimable", NSILA (non suppressible insulin like activity). L'activité supprimable représente environ un dixième de l'activité totale du sérum sur le tissu adipeux (174).

II - METHODES IMMUNOLOGIQUES

Ces méthodes utilisent la formation du complexe antigène Insuline-Anticorps anti-insuline. ARQUILLA et STAVITSKY (7) proposent la première technique de dosage en utilisant l'inhibition de l'hémagglutination passive des globules rouges tannés recouverts d'une couche d'antigène insuline et mis en présence d'anticorps anti insuline. Cette méthode est très complexe et peu sensible (0,1 mg d'insuline, soit 2,4 µU). De plus, aux réactions d'agglutinations secondaires dues à la présence d'impuretés dans l'insuline (104), s'oppose l'inhibition de cette réaction par un facteur sérique et spécifique (118). C'est pourquoi cette méthode est pratiquement abandonnée.

Actuellement les seules méthodes immunologiques utilisées sont des applications de celle mise au point par YALOW et BERSON (203), technique à la fois pratique et sensible de dosage de l'insuline. Le pouvoir antigénique de l'insuline permet la production d'anticorps par injections répétées d'insuline animale (de porc en général) au cobaye. Ces anticorps antiinsuline de porc ont la propriété de réagir de manière très voisine avec l'insuline humaine et l'insuline de porc. La réalisation du dosage est possible. L'originalité de la méthode consiste en l'utilisation d'une quantité constante d'hormone radioactive, l'insuline marquée à l'iode 131 ou 125. La présence d'hormone marquée et d'insuline humaine non marquée entraine une réaction de compétition entre ces deux insulines vis à vis des sites actifs de l'anticorps. Il y a dilution isotopique de l'insuline marquée.

Si T est la quantité totale d'insuline marquée B (bound) la quantité d'insuline marquée liée à l'anticorps, F (free) la quantité de cette même insuline restée libre, le rapport B/F ou B/T diminue en fonction de la quantité d'insuline non marquée introduite (T + insuline à doser). La détermination du rapport B/F ou B/T nécessite la séparation du complexe de l'hormone restée libre.

Les diverses techniques proposées reposent toutes sur le même principe. Elles ne diffèrent que par les moyens de séparation du complexe Antigène-Anticorps de l'insuline libre, opération assez délicate.

La première méthode de YALOW et BERSON faisait appel à une séparation par électrophorèse sur papier, l'insuline libre restant absorbée à l'origine, le complexe migrant avec les gamma-globulines. L'analyse de la radioactivité de la bande d'électrophorèse montre deux pics, l'un correspondant à l'insuline marquée libre, l'autre au complexe. Le rapport entre la radioactivité de ces deux plages correspond au rapport entre l'insuline libre et l'insuline liée aux anticorps. La même expérience est faite en présence de l'insuline à doser.

GRODSKY et FORSHAM (71) utilisent une méthode de séparation du complexe Antigène-Anticorps (Ag - Ac) par précipitation avec du sulfate de sodium, ROSSELIN (162), une séparation sur talc. En 1963 HALES et RANDLE (76) constatent que l'anticorps antiinsuline précipité préalablement par un antisérum spécifique est encore capable de réagir avec l'insuline et ils proposent une technique de dosage dite à deux anticorps. Cette méthode est actuellement la plus utilisée, nous la verrons en détail page 49.

La méthode radioimmunologique est spécifique puisqu'elle ne dose que l'insuline à l'exclusion de toutes autres substances plasmatiques en général (185). En fait l'étude de la proinsuline a montré que celle-ci peut réagir avec le sérum antiinsuline et que sa présence en quantité très faible dans le sang d'un sujet normal augmente beaucoup chez le sujet diabétique, obèse en particulier. La proinsuline peut donc introduire une erreur par excès dans les résultats du dosage de l'insulinémie.

Malgré cela, la relative facilité de mise en application de ces méthodes a permis d'étudier les variations de l'insulinémie chez les sujets normaux et diabétiques (89) (140) (161)). Les résultats présentent peu d'écarts suivant les auteurs. L'insulinémie d'un sujet normal à jeun se situe entre 10 et 25 µU par ml, valeurs bien éloignées des taux obtenus à l'aide des méthodes biologiques. Ces différences tiennent à la non identité de l'insuline immunologiquement active et de l'insuline biologiquement active. Les méthodes radioimmunologiques ne permettent pas d'apprécier toutes les formes d'insuline circulante comme l'insuline "liée" d'ANTONIADES ou "atypique" de SAAMAN par exemple.

Pour caractériser la grandeur mesurée à l'aide de cette méthode, RENOLD a proposé le terme IDI (immunologically detectable insuline) ou IRI (insulin - radioimmunologicalle).

Le manque d'homogénéité entre les résultats obtenus par les méthodes biologiques ou radioimmunologiques nous montrent qu'actuellement aucune méthode ne détermine exactement l'insulinémie. Chaque technique mesure une activité insulinique en rapport réel avec les propriétés de l'insuline que nous connaissons bien, c'est à dire l'insuline pancréatique, mais aucune ne dose exactement l'insuline telle qu'elle se trouve dans le plasma. Deux explications peuvent être données : d'une part l'insuline plasmatique n'est peut être pas identique à l'insuline pancréatique, d'autre part les méthodes utilisées sont peut être encore trop grossières, surtout dans le cas des dosages biologiques.

° °

°

D E U X I E M E P A R T I E

TRAVAUX PERSONNELS

Si tous les auteurs sont unanimes pour affirmer que l'hormone pancréatique joue un rôle de premier plan au niveau du passage des oses, acides gras ou acides aminés à travers certaines membranes cellulaires, en revanche, la nature même du processus reste inconnue. L'approche de ce problème ne peut être réalisée que par la recherche d'une méthode d'analyse quantitative de l'hormone faisant intervenir une activité biochimique de l'insuline liée à la perméabilité.

Comme nous avons pu le constater, dans les pages précédentes, la mesure de l'insulinémie présente de grandes difficultés, aussi, afin de préciser le mode d'action de cette hormone, avons nous centré nos recherches sur la mise au point d'une méthode de dosage de l'insuline capable par sa simplicité et sa rapidité, de s'adapter aux dosages en série indispensables pour la réalisation d'épreuves fonctionnelles.

Il nous a semblé indispensable de présenter en détail dans un premier chapitre, la méthode radioimmunologique de l'insuline qui, bien que ne répondant pas aux critères définis plus haut, est pratiquement la seule méthode permettant actuellement une exploration statistique et dynamique de l'insulinémie.

Dans un second chapitre, nous avons essayé de montrer que certaines cellules animales isolées, maintenues en survie, présentaient une sensibilité réelle à l'insuline, au niveau du transfert intracellulaire du glucose et que cette propriété pouvait servir de mesure à l'insulinémie.

Les résultats peu reproductibles que nous avons obtenus, nous ont amené à envisager, dans un dernier chapitre, la structure moléculaire de l'insuline en rapport avec son activité biologique vis à vis de certaines membranes. Cette étude nous a conduit à proposer un modèle moléculaire de la forme "active" de l'insuline.

C H A P I T R E I

DOSAGE RADIOIMMUNOLOGIQUE DE L'INSULINE

Le dosage radioimmunologique de l'insuline que nous avons utilisé est celui mis au point par HALES et RANDLE en 1963 (77). Nous indiquerons tout d'abord le principe de la méthode et nous décrirons le mode opératoire suivi lors de l'étude de l'insulinémie de sujets diabétiques°.

I - *PRINCIPE*

Cette méthode repose sur deux points essentiels :

a)- Le caractère antigénique de l'insuline permet la formation d'un complexe antigène-anticorps selon la réaction suivante :

$$(Ag) + (Ac) \rightleftarrows (Ag.Ac)$$ (page 42)

b)- Le complexe antigène-anticorps peut être isolé du milieu réactionnel par un procédé qui fait l'originalité de la technique de HALES et RANDLE : l'utilisation d'un sérum de lapin préalablement immunisé contre les gamma-globulines de cobaye, (Ac_L). Comme le complexe précédent (insuline (IAg) - anticorps (Ac_C) anti-insuline de cobaye) contient une fraction gamma-globulines de cobaye, le sérum de lapin anti-gamma-globulines de cobaye précipitera le complexe insulinique sans modifier sa formation.

°Ces dosages nous ont été confiés par Monsieur le Professeur AUBERTIN et ont été réalisés à l'INSERM, au laboratoire de Physique nucléaire appliquée et radiobiologie de Monsieur le Professeur BLANQUET.

La réaction est schématisée ci-dessous :

$$\underset{\text{soluble}}{(IAg - Ac_c)} + Ac_L \rightleftarrows \underset{\text{insoluble}}{(IAg.Ac_c)\ Ac_L)}$$

L'isolement, par filtration est alors aisé. La technique est simplifiée par mélange des deux anticorps, sérum de cobaye anti-insuline (Ac_c) et sérum de lapin anti-cobaye (Ac_L), avant leur addition au sérum en expérience, d'où le nom de méthode à "double anticorps" donné souvent à cette technique.

La réalisation du dosage s'effectue en plusieurs étapes :

Première étape :

Un volume connu de sérum à doser est mélangé avec une quantité de double anticorps, choisie de telle façon qu'elle soit insuffisante pour complexer toute l'insuline présente dans le milieu.

Si nous représentons par n_1 (IAg) la concentration d'insuline humaine dans le sérum et par (Ac) la concentration des doubles anticorps ajoutés, la réaction se schématise ainsi :

$$n_1\ (IAg) + (Ac) \rightleftarrows \underset{\text{complexe}}{x_1\ (IAg.Ac)} + \underset{\text{excès d'insuline libre}}{(n_1 - x_1)\ (IAg)}$$

Deuxième étape :

Une quantité déterminée d'insuline bovine marquée à l'iode radioactif (^{125}I ou ^{131}I) est ajoutée au mélange précédent. Il s'établit une réaction de compétition entre l'insuline bovine radioactive et l'insuline humaine du sérum à doser au niveau de sa fixation sur les sites actifs de l'anticorps. Le résultat se traduit par la présence dans le milieu d'un complexe schématisé par (IAg + I°Ag) Ac et d'un excès d'insulines bovine et humaine libres.

En comparant les complexes formés dans la première et la seconde étape, c'est à dire : (IAg.Ac) et (IAg + I°Ag) Ac, nous constatons la présence, dans le second complexe, de l'antigène marqué, donc d'une certaine radioactivité.

Les quantités d'anticorps et d'insuline marquée restant constantes, la variation de la radioactivité du complexe dépend uniquement de la concentration en antigène non marqué. Plus la radioactivité sera grande, plus la concentration en insuline humaine du sérum à doser sera faible.

La mesure de la radioactivité du complexe est réalisée grâce aux compteurs classiques, après isolement du complexe par filtration sur membrane d'acétate de cellulose. L'étalonnage est assuré par des solutions standards d'insuline humaine de concentration connue. Une réaction témoin permet de déterminer la radioactivité maximum atteinte par le complexe lorsque seuls de l'insuline marquée et des anticorps sont présents, c'est à dire lorsque l'on a formation du complexe (I°Ag.Ac).

En pratique environ 30 à 60 % de l'insuline marquée présente dans le milieu, se fixe sur les anticorps.

II - TECHNIQUE :

Nous avons réalisé ce dosage à l'aide de réactifs fournis prêts à l'emploi°. Nous reproduisons ci-après les conditions exactes du dosage°°.

°*Trousse-Réactif "Cea-Sen-Sorin" ref Insi - 125-3. Ces produits sont préparés par le centre de recherches nucléaires italien (Société Ricerche Impianti Nucleari - Saluggia) (Vercelli).*

°°*Fiche technique 68/5 fournie par la "Sorin".*

A - Réactifs :

1 - Tampon A : ce tampon sert à diluer l'antisérum et l'insuline marquée. Sa composition est la suivante :

Phosphate monosodique, 2 H_2O..... 6,2 grammes
Thiomersalate de sodium..... 0,25 "
Albumine bovine (fraction V)..... 1 "
Soude 2N, Q.S., pour ajuster le pH à..... 7,4 "
Eau bidistillée.....Q.S 1000 ml

Cette solution est à conserver à 4° C.

2 - Tampon B : il sert à diluer l'insuline standard ou le sérum. Il se compose de :

Chlorure de sodium..... 9 grammes
Tampon A.....Q.S 1000 ml

Cette solution est à conserver à 4° C.

3 - Tampon C : cette solution riche en protéines sériques est utilisée pour laver le précipité d'anticorps, elle contient :

Sérum de cheval..... 50 ml
Tampon A.....500 ml

Cette solution, ajustée à pH 7,4 est conservée à 4° C.

4 - Système de double anticorps :

C'est un mélange de deux antisérums : antisérum de cobaye antiinsuline et antisérum de lapin anticobaye. Le mélange est fourni à l'état lyophilisé et peut être conservé de 2 à 4° C. Il se présente sous forme de poudre que l'on solubilise au moment de l'emploi de l'eau bidistillée.

5 - Insuline marquée :

Nous avons employé l'insuline marquée à l'iode 131 ou l'insuline marquée à l'iode 125 qui, grâce à sa plus grande période, est utilisable plus longtemps. L'une ou l'autre se présente en solution concentrée qui doit être conservée à -20° C jusqu'à l'emploi. Chaque flacon contient 0,1 µg d'insuline par ml de solution. Au moment de l'utilisation on réalise une dilution avec du tampon A pour obtenir une solution contenant 250 µg pour 0,1 ml. Cette dernière dilution peut être conservée une semaine à 4° C.

6 - Solutions standards d'insuline humaine :

L'insuline est fournie en solution concentrée acide à 5 000 mU/ml. A partir de cette solution, on prépare une première dilution avec du tampon B, telle que 1 ml contienne 2 µg soit 50 mU d'insuline. La solution finale, préparée extemporanément est obtenue par dilution de la précédente à l'aide de tampon B pour que l'on ait une solution à 500 µU/ml.

A partir de cette solution on prépare une série de standards contenant 10, 20, 50, 100, 200 et 500 µU par ml.

B - Mode opératoire :

La technique comprend trois étapes :
- préparation du complexe Ac - Ag
- séparation du précipité
- mesure de la radioactivité et expression des résultats.

1 - Préparation du complexe :

Nous avons résumé sur le tableau IV les différentes opérations à réaliser pour effectuer un ou plusieurs dosages. Comme nous pouvons le constater nous devons préparer quatre séries de tubes.

- La première série n°1 ne contient que des anticorps et de l'insuline marquée. Elle constitue la réaction "témoin".

- La deuxième série n°2 représente la gamme étalon. Elle est constituée par le mélange des anticorps avec les solutions de la série des standards d'insuline. A chaque dilution correspond un groupe de tubes b_1 b_2 b_3....b_6.

- La troisième série n°3 comporte les échantillons à doser. Dès son prélèvement sur héparine, et au plus tard une heure après, le sang est centrifugé, le plasma est recueilli et congelé à -20° C. Au moment du dosage, les plasmas sont décongelés progressivement et centrifugés pour éliminer la fibrine. Chaque échantillon est mélangé aux anticorps et à l'insuline marquée et constitue le groupe c_1 c_2 c_3....c_x suivant le nombre d'échantillons à doser.

- La quatrième série n°4 ne contient pas d'anticorps et seulement de l'insuline marquée. Elle sert de contrôle à la filtration.

Pour permettre une meilleure analyse et éviter toute erreur, chaque tube est réalisé en trois exemplaires.

La répartition des réactifs se fait à l'aide de microseringues° de 0,1 ml, dans l'ordre indiqué sur le tableau.

TABLEAU IV

MODE OPERATOIRE

	1	2						3			4
Séries		b_1	b_2	b_3	b_4	b_5	b_6	c_1	c_2	c_3	
Anticorps (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0
Tampon B (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
Insuline étalon (µU/ml)	0	20	30	50	100	200	500	0	0	0	0
Echantillons	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0
	Séjour à 4° C pendant 18 heures										
Insuline marquée (ml)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
	Séjour à 4° C pendant 18 heures										
Radioactivité (cps/mn)	R_0	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R'_1	R'_2	R'_3	D_0

° *"Microliter" Hamilton C.O. - Californie - U.S.A.*

2 - Filtration du précipité :

Comme nous l'avons vu sur le tableau précédent, après addition d'insuline marquée, les tubes sont placés à 4° C pendant dix huit heures. Au bout de ce délai, ils sont repris et après réchauffement à la température du laboratoire, le contenu est filtré sous vide à l'aide d'appareils à filtration Millipore°.

Les filtres utilisés sont des membranes "oxoïd"°°, composées uniquement d'acétate de cellulose. L'épaisseur est d'environ 120 microns. Elles sont livrées en disques de 14 cm de diamètre dans lesquels on découpe, à l'emporte pièce, des disques de 2,5 cm de diamètre. Les pores des membranes ayant une dimension de 0,5 à 1 micron pour la couche supérieure et 3 à 5 pour la couche inférieure, ces filtres présentent une efficacité remarquable au point de vue filtration et l'avantage de ne pas se colmater.

Fragiles à l'état sec, ces filtres deviennent très résistants à l'état humide. Quelques heures avant leur emploi ils sont mis à tremper dans le tampon C. L'imprégnation doit être parfaitement homogène, sinon la membrane est à rejeter. Au moment de la filtration, un filtre est prélevé et placé sur le verre fritté de l'appareil Millipore. La membrane adhère facilement. Le contenu du premier tube est agité et déposé sur le filtre à l'aide d'une pipette. L'opération doit être menée lentement pour rassembler l'ensemble du précipité au centre du filtre et éviter les dépôts sur les bords. Le tube ayant contenu le précipité est alors rincé à trois reprises avec chaque fois un millilitre de tampon C. Cette solution de lavage est versée sur le filtre, toujours lentement pour éviter toute perte de précipité. On laisse sécher le filtre quelques instants puis on le décolle délicatement de son support à l'aide d'une pince brucelle et on le place dans un tube de comptage de l'appareil à scintillations.

° *Appareil Millipore S.A. 92 - Malakoff*

°° *Laboratoire Biolyon.*

3 - Expression des résultats :

La mesure est réalisée dans un compteur à scintillations. Le résultat est exprimé en coups par minute. On détermine la moyenne des valeurs obtenues pour les trois tubes identiques de chaque série. Ces moyennes sont corrigées par soustraction de la radioactivité provenant du bruit de fond de l'appareil et de la radioactivité D_0 mesurée sur la série n°4 représentant la contamination au cours de la filtration. Ce sont ces moyennes corrigées que nous avons représentées sur le tableau IV.

Etablissement de la courbe étalon

Soit R_0 la radioactivité moyenne de la série n°1, série "témoin", R_1, R_2, R_3.....R_6, les valeurs correspondantes de la série 2, série "étalon". La courbe d'étalonnage est réalisée en portant en ordonnée le rapport de la radioactivité "témoin" à la radioactivité de la série "étalon" et en abscisse, la concentration en µU par ml de l'insuline standard correspondante à chaque tube b_1.....b_6. On obtient une droite représentée sur la figure 3 page 63.

Dosage de l'insuline inconnue des sérums

A chaque sérum à doser, correspond une valeur R'_1, R'_2, R'_3,.....R'_x, de la radioactivité moyenne corrigée de la même façon que précédemment. Il est donc facile de calculer le rapport $\frac{Ro}{R'_1}$...$\frac{Ro}{R'_x}$ et en se référant à la courbe étalon, de déduire la quantité d'insuline présente dans l'échantillon.

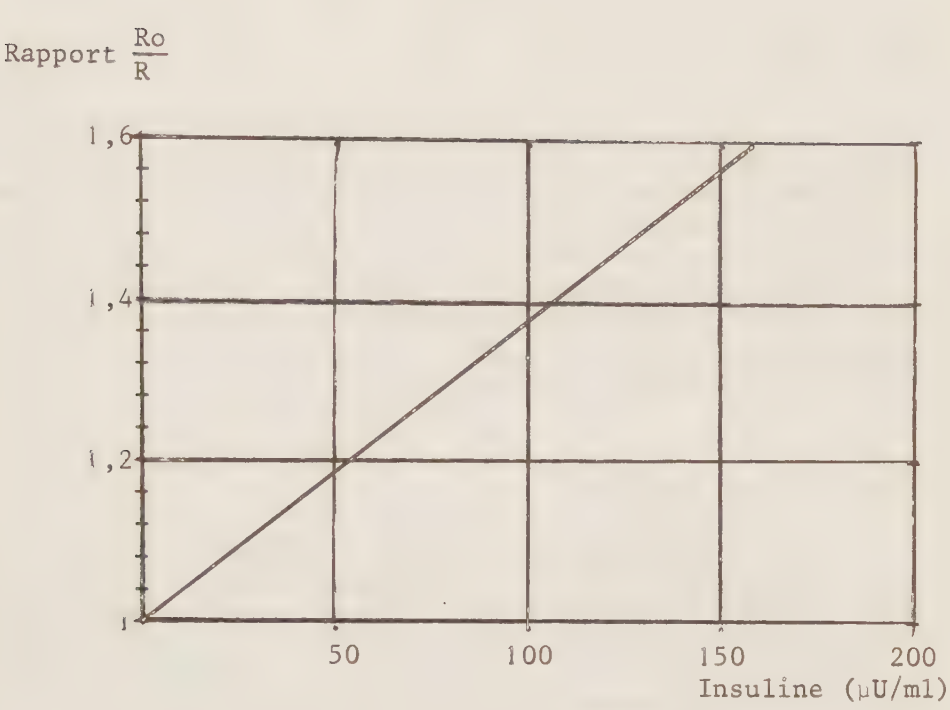


Figure 3 : Courbe étalon du dosage radioimmunologique de l'insuline.

REMARQUES :

- Une expérience peut être considérée comme valable lorsque les résultats pour un même échantillon sont homogènes et lorsque le contrôle de la filtration (série N°4) montre que moins de 5 % de la radioactivité totale est restée sur le filtre. La radioactivité totale est mesurée par comptage d'un échantillon d'insuline marquée de concentration identique à celle utilisée dans la série d'expériences.

- La courbe d'étalonnage obtenue est caractéristique de l'insuline qui sert aux standards et de l'insuline marquée utilisée. A chaque expérience il faut refaire une courbe d'étalonnage car la pente de la droite varie souvent.

III - RESULTATS

A l'aide de cette méthode nous avons pu déterminer les valeurs de l'insulinémie de sujets normaux et de diabétiques et vérifier ainsi les constatations faites par de nombreux auteurs. Nous ne rapporterons pas ici tous les résultats numériques obtenus. Nous avons préféré montrer, à l'aide de quelques exemples graphiques, le profil obtenu lors de l'exploration du métabolisme glucidique et de l'insulinémie chez certains sujets à jeun d'une part et lors d'épreuves dynamiques d'autre part.

Insulinémie à jeun :

L'étude faite sur une centaine de sujets normaux laisse apparaître une insulinémie variant entre 14 et 20 µU par ml. Ces valeurs sont plus faibles chez les sujets à diabète consomptif, inférieures même à 10 µU. Elles sont par contre plus élevées chez les sujets à diabète non consomptif, obèses surtout. L'insulinémie à jeun peut alors atteindre 100 µU par ml.

Insulinémie au cours d'épreuves dynamiques :

Il est plus intéressant d'étudier le comportement de l'insulinémie au cours d'épreuves dynamiques. Deux tests sont en général utilisés :

- l'hyperglycémie provoquée, orale ou veineuse
- le test à la tolbutamide.

Nous avons reproduit ci-dessous les résultats obtenus lors d'épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale. Nous avons traduit les résultats obtenus sous forme de courbes qui donnent les variations d'une part de la glycémie en g/l, d'autre part de l'insulinémie en µU par ml en fonction du temps. Trois cas sont représentés, nous les envisageons successivement :

Sujet normal :

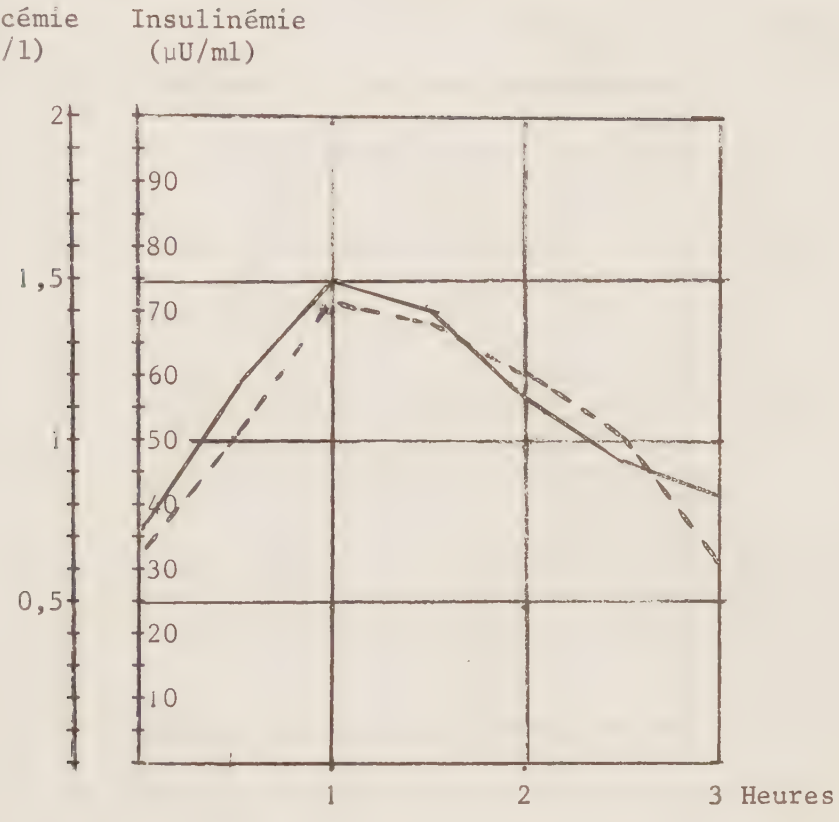


Figure 4 : Courbe glycémie : Traits pleins ——
Courbe insulinémie : Traits pointillés ----

Nous pouvons constater que lors de surcharge glucosée, le taux de l'insulinémie varie de façon analogue à celle de la glycémie. A l'élévation de la glycémie qui atteint sa valeur maximum au bout d'une heure, correspond une élévation de l'insulinémie qui va provoquer une baisse de la glycémie. Parallèlement il y aura une chute d'insulinémie.

Sujet à diabète consomptif :

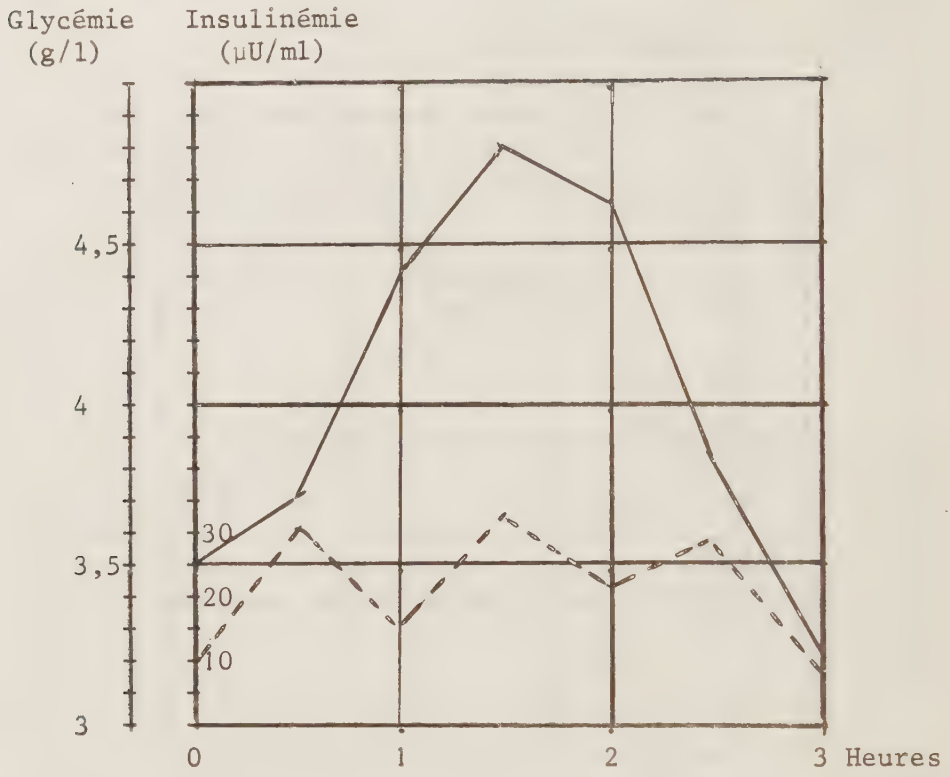


Figure 5 : Courbe glycémie : traits pleins ——
Courbe insulinémie : traits pointillés ----

Nous remarquons tout de suite la non concordance des courbes de la glycémie et de l'insulinémie. La glycémie déjà importante avant la surcharge glucosée (3,5 g/l) s'élève de façon anormale pour atteindre son maximum au bout d'une heure et demi, valeur supérieure à 4,5 g/litre. L'insulinémie reste basse et signale la défaillance de la réponse pancréatique. Sa faible valeur explique l'élévation importante de la glycémie.

Sujet à diabète non consomptif :

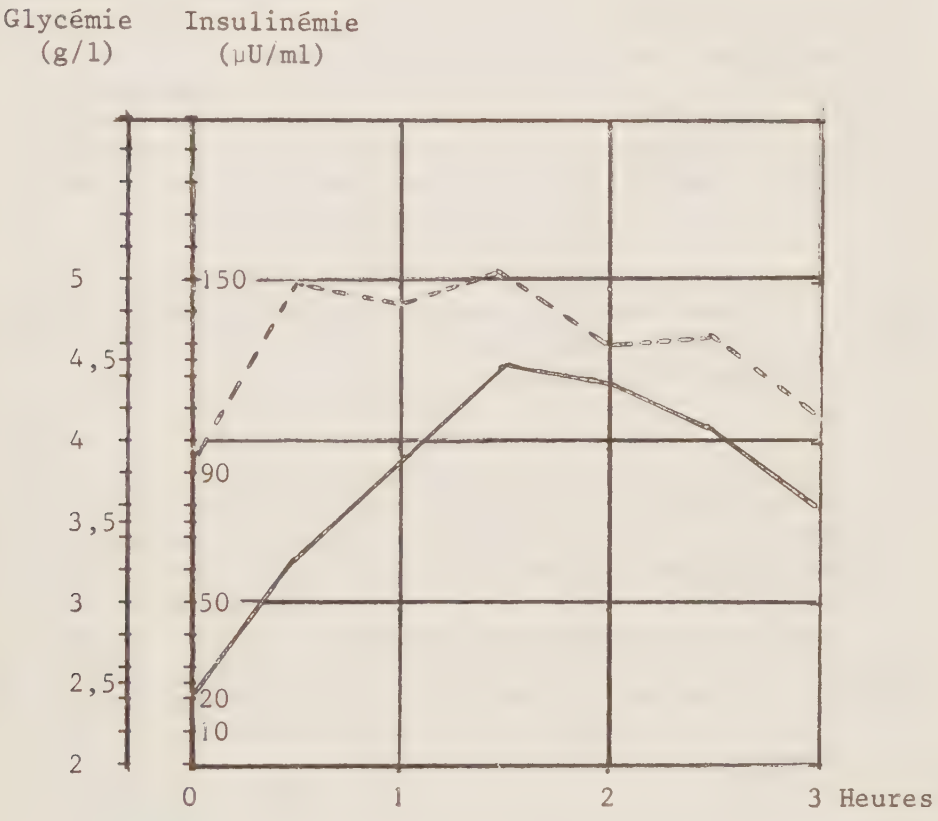


Figure 6 : Courbe glycémie : traits pleins ——
Courbe insulinémie : traits pointillés ----

Dans ce cas, les valeurs de la glycémie sont moins élevées que dans le cas précédent, mais le retour à la valeur normale est très long puisqu'il n'est pas réalisé au bout de trois heures. L'insulinémie est très élevée dès le départ (95 µU) et ses variations suivent celles de la courbe glycémique démontrant la présence dans le sérum de quantités subnormales d'insuline. Puisque le sujet présente un diabète, on doit supposer que cette insuline, active immunologiquement est inactive biologiquement.

CONCLUSION :

Nous venons de décrire en détail la technique de HALES et RANDLE qui donnent à l'heure actuelle, les résultats les plus valables. En effet, la sensibilité de la méthode définie par la plus petite quantité d'insuline, non marquée, capable de modifier le degré de liaison de l'anticorps avec l'insuline marquée et par suite de faire varier de façon apparente la radioactivité du complexe dépend uniquement de la sensibilité de la mesure radioactive. Elle est suffisante pour déceler des quantités d'insuline de l'ordre de 10^{-9}g par litre, soit près de 5 µU par millilitre. La reproductibilité des mesures, étudiée en détail dans la thèse de BOEUF (28) a été trouvée très convenable compte tenu des faibles quantités d'insuline mesurées.

Cette technique se prête bien aux dosages en série et elle a même été adaptée à l'analyse automatique par POLLARD et WALDRON (144). Ces auteurs utilisent un autoanalyseur monocanal classique type Technicon°. Le mélange anticorps, insuline marquée et sérum est réalisé à la sortie de la pompe proportionnante et est laissé trois heures en incubation à 14° C. D'après les auteurs, ce délai est suffisant pour que la réaction de compétition entre les deux antigènes se développe. Le mélange passe ensuite sur une membrane filtrante en acétate de cellulose. Le précipité est recueilli et envoyé devant la fenêtre d'un compteur à scintillations.

Si cette méthode semble mettre un point final à toutes les recherches tendant à améliorer le dosage de l'insuline circulante, son emploi est cependant très limité. Pourquoi ? Il semble bien que les difficultés techniques et matérielles à résoudre (en particulier le montage du système de filtration et du comptage radio-actif) aient jusque là limité son utilisation. Ces problèmes dépassent même beaucoup l'intérêt apporté par l'automatisation. De plus le déroulement de la réaction antigène-anticorps à 14° C est très critiquable. Des auteurs, tels YALOW et BERSON, ont insisté sur l'importance d'un contact de 18 heures au moins entre les divers réactifs

° *Technicon - Instrument Corporation-Ardsley (N.Y)*

et d'une température de 4° C, température qui évite toute altération du complexe et toute dégradation de l'insuline radioactive. Il paraît donc préférable d'utiliser la technique initiale de HALES et RANDLE que nous venons de décrire, même si sa durée est souvent un handicap. Son emploi est toutefois limité aux services hospitaliers car l'obligation d'utiliser des radioisotopes suppose un équipement, tant au point de vue utilisation (protection) qu'au point de vue mesure (compteur), qui n'est pas à la portée de certains laboratoires d'analyses.

Si ces quelques remarques n'apportent que de faibles oppositions à la technique radioimmunologique précédente, bien plus importantes sont les critiques soulevées par le principe même. Tout le dosage repose sur la réaction antigène-anticorps et l'on dose une activité antigénique, celle de l'insuline circulante.

Pour que le résultat soit valable il faut que les sérums étudiés ne contiennent pas d'anticorps antiinsuline avant l'expérience. Cela interdit l'emploi de cette technique pour l'étude de l'insulinémie de sujets traités depuis quelque temps à l'insuline. L'apparition d'anticorps est, comme nous l'avons vu page 42, constante dans les deux mois qui suivent le début du traitement.

D'autre part, l'insuline biologiquement active et l'insuline immunologiquement active sont loin d'être identiques. Dans la première partie de ce travail, nous avons rapporté les prises de position des divers auteurs sur ce sujet extrêmement important. Nous ne reviendrons pas sur leurs conclusions mais, à la lumière des résultats obtenus page 66, nous constatons que dans le cas de diabète non consomptif l'insulinémie peut être considérée comme normale, c'est à dire que dans le sérum existe une insuline intacte immunologiquement. Et pourtant, puisqu'il y a diabète, il faut admettre que cette insuline est inactive biologiquement. Sous quelle forme se trouve t-elle ? Peut être sous forme de proinsuline, forme intermédiaire de biosynthèse possèdant les propriétés immunologiques (69bis) de l'insuline mais non les propriétés biologiques (94). Le dosage radioimmunologique ne permet pas de conclure dans ce cas.

CHAPITRE II

ESSAIS BIOLOGIQUES

Nous avons rapporté, page 46, les diverses méthodes biologiques proposées depuis une vingtaine d'années pour mesurer l'insulinémie. Les plus sensibles utilisent la propriété du tissu adipeux de métaboliser le glucose en présence d'insuline : un fragment de ce tissu incubé avec du glucose et de l'insuline libère une quantité de gaz carbonique proportionnelle à la concentration d'insuline mise en jeu. Le gaz carbonique est dosé volumétriquement à l'aide d'un appareil de Warburg (BALL, MARTIN, COOPER) (12) ou par mesure de la radioactivité si le glucose est marqué sur C_1 par du carbone 14 (RENOLD, MARTIN et DAGENAIS) (156).

La durée des mesures manométriques s'opposant à nos impératifs de rapidité et de simplicité et l'utilisation de radioisotopes n'étant pas notre objectif, nous avons éliminé ces méthodes et nous avons recherché un index métabolique facilement et rapidement mis en évidence. Le grand développement des techniques automatiques de dosage du glucose a guidé notre choix et nous avons pensé déterminer ainsi la quantité de glucose consommé par le tissu animal sous l'influence de l'insuline.

Pour réaliser ce dosage, comprenant nécessairement de nombreux échantillons, l'utilisation de fragments de tissus animaux s'avérait difficile en raison du grand nombre d'animaux nécessaires, de la difficulté de standardiser les

divers échantillons tissulaires et de l'obligation d'éliminer ces fragments avant le dosage automatique du glucose. Cela représentait une perte de temps non négligeable.

L'utilisation de plus en plus répandue de cultures de cellules vivantes isolées pour l'étude de phénomènes biochimiques ou de manifestations virales (52) et les résultats fort encourageants obtenus au cours de ces expériences ont démontré la grande activité métabolique de ces cellules et ont orienté nos recherches. Nous avons préparé, à partir de tissus de rat, des cellules isolées vivantes, gardant toutes leurs possibilités métaboliques. Nous les avons mises à incuber, dans un milieu de culture classique, contenant du glucose dont la concentration est mesurée avant et après l'incubation. La différence permet de déceler une consommation glucosée des cellules.

Ce chapitre constitue le compte-rendu de nos expériences :

- dans un premier paragraphe, nous décrirons la technique analytique utilisée pour doser le glucose,

- dans un second paragraphe, nous détaillerons la préparation des cellules et le protocole de nos expériences,

- dans un troisième paragraphe, nous discuteronss les résultats obtenus.

I - TECHNIQUE ANALYTIQUE

A - Principe :

Le glucose est dosé grâce à ses propriétés réductrices vis à vis du ferricyanure de potassium en milieu alcalin. La solution aqueuse jaune de ferricyanure est réduite en solution incolore de ferrocyanure de potassium. En présence d'un excès de ferricyanure, il y a simplement diminution de l'intensité de la coloration jaune. Il s'agit d'une colorimétrie inverse : l'intensité de la décoloration est proportionnelle à la concentration du glucose dans le milieu. La mesure de l'absorption de la solution est réalisée à 420 nm.

B - Réactifs :

1 - Solution de ferricyanure de potassium :

ferricyanure de potassium.....	0,25	g
carbonate disodique anhydre.....	20	g
chlorure de sodium.....	9	g
eau distillée.....Q.S	1000	ml

2 - Solution de carbonate de sodium :

carbonate disodique anhydre.....	20	g
chlorure de sodium.....	9	g
eau distillée.....Q.S	1000	ml

3 - Solution de chlorure de sodium :

chlorure de sodium.....	9	g
cyanure de potassium°.....	5	g
eau distillée.....Q.S	1000	ml

4 - Solution étalon en glucose :

glucose anhydre.....	1,25	g
eau distillée.....Q.S	1000	ml

5 - Solution diluée de ferricyanure de potassium :

au moment de l'emploi mélanger 800 ml de la solution 1 avec 200 ml de la solution 2.

° *Le cyanure de potassium agit ici comme agent sensibilisant.*

C - Technique :

L'appareillage utilisé est un autoanalyseur Technicon à monocanal. Le schéma du manifold représenté sur la figure 7 indique le montage utilisé pour l'analyse et permet de suivre les diverses étapes de celle-ci. L'appareil se compose : d'un distributeur d'échantillon (A), d'une pompe proportionnante (B), d'un dialyseur (C), d'un bain-marie à 95° C (D), d'un photomètre (E) et d'un enregistreur (F).

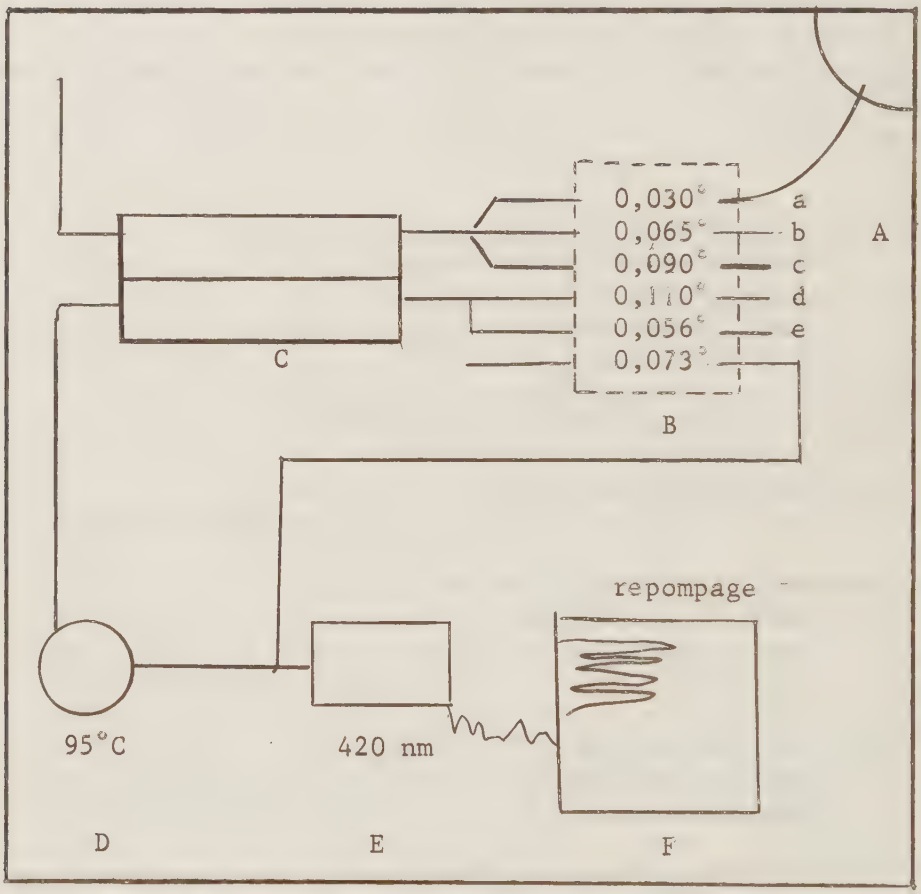


Figure 7 : Schéma du montage réalisé pour le dosage du glucose par le ferricyanure de potassium.

" *Ces chiffres indiquent en pouces les différents diamètres des tubes utilisés.*

Le déroulement de l'analyse est le suivant° : le tube *a* sert au pompage de l'échantillon à doser placé sur le plateau distributeur A. Cet échantillon est segmenté par de l'air provenant du tube *b*. Il est dilué avec une solution de chlorure de sodium provenant du tube *c*. Ce mélange est dialysé contre une solution de ferricyanure de potassium amené par le tube *d* et segmenté par l'air du tube *e*. Une fraction du glucose passe à travers la membrane de dialyse et se mélange avec le ferricyanure de potassium. La solution restante de l'échantillon est éliminée, tandis que le dialysat est envoyé vers le bain-marie à huile, thermostaté à 95° C.

La réaction se développe et l'intensité de la décoloration est mesurée à 420 nm par passage de la solution dans la cuve du colorimètre tubulaire. L'enregistreur décrit automatiquement sur un papier graphique les variations du pourcentage de transmission grâce aux données électriques fournies par le photomètre. Le papier se déroulant avec un mouvement uniforme on obtient une courbe d'enregistrement en fonction du temps. Puisque l'on mesure une décoloration, on doit faire un réglage préliminaire permettant d'établir la valeur 100 % de transmission sur l'eau distillée et la valeur de la ligne de base sur le réactif au ferricyanure seul.

A l'aide d'une solution de titre connu, on établit une gamme allant de 0,2 à 1 gramme de glucose par litre. L'enregistrement se présente sous forme d'une succession de pics. On trace la courbe d'étalonnage en portant en abscisse les concentrations et en ordonnée les hauteurs des pics.

° *Méthodologie Technicon N - 2b - Nov. 1966.*

II - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

La préparation des cellules constitue la partie la plus délicate de nos essais. En effet l'obtention de cellules vivantes, possédant toutes les propriétés biologiques du tissu de départ, est une condition primordiale au bon déroulement ultérieur de l'expérience. Nous avons employé deux méthodes de préparation distinctes : l'une valable pour les cellules isolées de tissu cardiaque, rénal et musculaire, l'autre ne s'appliquant qu'aux cellules adipeuses. Nous envisagerons successivement l'une et l'autre préparation :

A - Préparation de cellules cardiaques, rénales et musculaires.

- Réactifs :

1 - Solution tampon PBS pH 7,5 : elle est préparée par simple mélange des trois solutions suivantes :

Chlorure de sodium	8	g
Chlorure de potassium	0,2	g
Phosphate disodique (2 H_2O)	1,15	g
Phosphate monopotassique	0,2	g
Eau bidistillée	800	ml
Chlorure de calcium	0,1	g
Eau bidistillée	100	ml
Chlorure de magnésium (6 H_2O)	0,1	g
Eau bidistillée	100	ml

2 - Solution de trypsine :

Trypsine	0,25	g
Tampon PBS	100	ml

3 - Tampon de Krebs-Ringer :

Chlorure de sodium	7	g
Chlorure de potassium	0,35	g
Chlorure de calcium	0,28	g
Chlorure de magnésium	0,3	g
Phosphate monosodique	0,16	g
Carbonate acide de sodium	1,05	g
Eau bidistillée Q.S	1000	ml

- Mode opératoire :

La technique utilisée est celle décrite par DULBECCO (52), WALLIS (188) et modifiée par YOUNGNER (207). Tous les tissus proviennent de rats blancs de 200 à 300 grammes, issus d'un même élevage, tués par section des carotides. Environ un gramme de chaque tissu cardiaque, rénal et musculaire est prélevé, coupé en minces fragments de 4 à 5 mm de long, et placé dans un tube à centrifuger contenant déjà quelques millilitres de tampon PBS. Après quelques minutes de contact, le tampon est éliminé par décantation et remplacé par deux ou trois millilitres de tampon frais. Les lavages sont répétés trois fois pour enlever les cellules sanguines.

Les fragments de tissu sont alors remis en suspension dans quelques millilitres (10 environ) de la solution de trypsine. Après 10 minutes d'incubation à 37° C, la solution de trypsine est éliminée par décantation et remplacée par environ 20 ml de solution fraîche de trypsine. Le mélange est placé au bain-marie à 37° C, en maintenant une agitation douce et constante à l'intérieur du tube. Au bout de 10 minutes d'incubation, la suspension est filtrée à travers trois épaisseurs de gaze hydrophile stérile pour éliminer les particules de tissu non digérées et les fibres de tissu conjonctif. Environ 5 ml de solution fraîche de trypsine sont ajoutés aux fragments de tissus restants dans le tube. Après 10 minutes d'incubation, la solution est filtrée de la même façon que précédemment. Cette opération est répétée une dizaine de fois jusqu'à ce que le tissu perde sa couleur brune et prenne l'aspect d'une masse blanchâtre qui tend à s'agglomérer.

Tous les liquides de filtrations sont réunis dans un même tube taré. Ils forment une suspension trouble de cellules et de fins débris qui est centrifugée à 2500 tours par minute pendant 5 minutes. Le culot est constitué par les cellules. Le surnageant est éliminé. Le culot est lavé trois ou quatre fois à l'aide de quelques millilitres de tampon PBS. Après le dernier lavage le tube contenant le culot est pesé et les cellules sont remises en suspension dans un volume connu de tampon Krebs-Ringer.

B - Préparation de cellules adipeuses isolées.

Nous avons utilisé la technique mise au point par RODBELL (159) consistant en une digestion enzymatique du tissu adipeux avec de la collagénase, protéinase extraite du "Coli Histolyticum". Le tissu adipeux épididymaire employé provient de rats mâles de 200 à 300 grammes normalement nourris.

- Réactifs :

- Collagénase en poudre°
- Eau physiologique
- Tampon Krebs-Ringer,

- Préparation :

Les rats utilisés pour l'expérience, sont tués et saignés de la même façon que précédemment. Le prélèvement du tissu est effectué très délicatement aussitôt après la mort de l'animal, pour éviter toute altération du tissu particulièrement sensible. La graisse épididymaire recueillie est lavée dans quelques millilitres d'eau physiologique pour éliminer les cellules sanguines, puis coupée en petits fragments et placée dans un tube à centrifuger taré, contenant 3 ml de tampon Krebs-Ringer à pH 7,4, 10 mg de collagénase et 9 micromoles de glucose. Le tube est placé au bain-marie à 37° C. Au bout d'une heure d'incubation pendant laquelle on a maintenu une agitation constante, le tissu se désagrège et les cellules adipeuses libérées sont mises en évidence par l'augmentation de trouble du milieu. Les fragments de tissu non détruits sont éliminés et la suspension centrifugée pendant trois minutes à 3000 tours par minute. On observe alors trois couches bien distinctes :

- en surface de fines gouttelettes d'huile témoignent de la lyse de certaines cellules.
- Immédiatement en dessous se trouvent les cellules adipeuses isolées.
- Le culot est constitué par des cellules non adipeuses provenant des parois des capillaires ou du tissu épithélial.

° *Produit Calbiochem.*

Pour cette préparation on utilise de préférence du matériel plastique qui évite la lyse des cellules.

C - Prélèvement des cellules.

Les diverses cellules obtenues sont toutes conservées en survie dans un volume déterminé du tampon de Krebs-Ringer. Pour chaque suspension on sait que 1 ml correspond à x mg de cellules. Au moment de l'expérience la répartition des cellules dans les divers tubes se fait de façon suivante : on soumet chaque suspension à une agitation continue et uniforme et à l'aide d'une pipette automatique de 1 ml on procède au prélèvement de la suspension et au remplissage des tubes de l'expérience. Chaque tube contient donc x mg de cellules. L'erreur est très faible et la très grande rapidité de ce procédé nous l'a fait préférer aux techniques de numération cellulaire d'un échantillon de chaque suspension.

D - Technique expérimentale.

- Réactifs :

1 - Solution mère d'insuline :

elle est préparée par dissolution de dix milligrammes d'insuline bovine° (cristallisée à 26 U par mg) dans 26 ml d'eau distillée amenée à pH voisin de 2 par de l'acide chlorhydrique. Cette solution est à conserver à -20° C. Elle contient 10 U d'insuline par millilitre.

2 - Première dilution d'insuline :

Elle est préparée par dilution au centième de la solution mère dans l'eau distillée. Cette solution est stable huit jours à 4°C. Elle contient 100 mU d'insuline par millilitre.

3 - Seconde dilution d'insuline :

Elle est préparée extemporanément par dilution au millième de la solution précédente dans le tampon de Krebs-Ringer auquel on ajoute 2 grammes par litre de gélatine pour empêcher la fixation de l'insuline sur les parois en verre. Cette solution contient 100 µU d'insuline par millilitre.

° *Produit Calbiochem.*

4 - Solution de glucose :

Glucose..... 1,2 g
Tampon Krebs-Ringer.....Q.S 1000 ml

- Technique :

Toutes nos expériences sont menées suivant le même schéma : incubation des diverses cellules dans un milieu glucosé, d'une part en absence, et d'autre part en présence de concentrations croissantes d'insuline. Pour chaque catégorie de cellules, rénales, musculaires, cardiaques et adipeuses, nous avons préparé des séries de dix huit tubes à incubation. Toutes les mesures ayant été faites en triple exemplaire, chaque série est donc constituée de six échantillons différents. Ils contiennent les mêmes quantités de cellules et de glucose mais des concentrations croissantes d'insuline. Nous avons reproduit sur le tableau V la composition des mélanges utilisés (n° 2 à 7) en indiquant la présence d'un groupe "témoin" de 3 tubes (n° 1), contenant la même quantité de glucose que les autres tubes mais ne renfermant pas de cellules.

TABLEAU V

COMPOSITION DES ECHANTILLONS

Tubes	1	2	3	4	5	6	7
Cellules (mg)	0	15	15	15	15	15	15
Glucose (mg)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Insuline (µU)	0	0	10	20	50	100	500
Tampon Krebs-Ringer	Q.S à 1 ml						

Toute la série de tubes ainsi préparée est placée au bain-marie à 37° C. Nous avons utilisé une incubation de 120 minutes qui correspond, comme nous le verrons plus loin au sujet des cellules adipeuses, à la durée la plus favorable pour déterminer l'action de l'insuline dans nos conditions expérimentales.

Au bout de ce délai, le glucose résiduel est dosé par la technique analytique décrite page 75. La concentration glucosée mesurée sur le tube 1 est comparée à celles trouvées sur les tubes 2 à 7. Toute diminution est attribuée à une consommation glucosée des cellules.

III - RESULTATS

Pour établir une comparaison entre les diverses expériences, nous avons rapporté toutes les consommations glucosées à une même concentration initiale : 60 mg pour 100 ml. Pour chaque catégorie de cellules : rénales, musculaires, cardiaques et adipeuses, nous avons retenu vingt résultats et éliminé les résultats aberrants pour lesquels aucune consommation en glucose n'est décelable indiquant la mort certaine de la majeure partie des cellules utilisées.

Ces résultats sont reproduits sur les tableaux VI à IX, les consommations glucosées étant exprimées en milligrammes pour 100 millilitres. Chaque série de vingt résultats nous a permis de calculer la moyenne (m) et l'écart type (σ) (avant-dernière et dernière colonne des tableaux) correspondants aux consommations glucosées des diverses cellules :

- Cellules rénales de rat :
  tableau VI page 82.
- Cellules musculaires (muscle strié) de rat :
  tableau VII page 83.
- Cellules cardiaques de rat :
  tableau VIII page 84.
- Cellules adipeuses de graisse épididymaire de rat :
  tableau IX page 85.

TABLEAU VI

GLUCOSE (mg) CONSOMME PAR LES *CELLULES RENALES*
EN FONCTION DE CONCENTRATIONS CROISSANTES D'INSULINE.
(Concentration initiale glucosée : 60 mg).

Séries / µU/ml Insuline	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	m	σ
0	5	4	6	7	5	4	4	5	5	5	4	5	6	5	4	4	5	7	7	5	5	1
10	5	5	5	6	4	5	6	6	6	5	3	2	5	6	5	3	6	6	7	6	5	1,2
20	7	6	7	8	5	5	6	7	4	6	7	4	7	6	6	4	8	6	8	7	6	1,3
50	6	6	5	8	4	6	5	4	8	4	5	4	5	7	4	4	5	5	8	7	5	1,3
100	5	6	5	9	3	4	5	7	6	5	5	2	9	8	6	6	8	6	8	7	6	1,8
500	4	3	6	6	4	3	3	3	4	5	1	4	5	6	3	5	4	8	7	4	4	1,6

TABLEAU VII

GLUCOSE (mg) CONSOMME PAR LES *CELLULES MUSCULAIRES*
EN FONCTION DE CONCENTRATIONS CROISSANTES D'INSULINE.
(Concentration initiale glucosée : 60 mg).

Séries / µU/ml Insuline	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	m	σ
0	5	3	5	6	7	5	4	5	5	4	6	6	6	5	5	8	6	3	6	5	5	1,2
10	7	5	7	7	6	7	8	7	6	5	7	8	7	6	9	10	8	6	9	6	7	1,3
20	9	8	8	9	9	8	9	8	7	7	8	10	9	8	10	9	10	8	11	9	9	1
50	11	10	9	11	11	10	10	10	9	9	12	11	10	11	10	12	11	12	10	11	10	0,9
100	13	11	12	13	14	14	12	12	13	12	15	14	13	14	13	14	14	15	14	13	11	1,7
500	11	10	12	11	12	12	12	13	13	11	13	12	13	13	12	13	14	13	11	13	10	2,3

TABLEAU VIII

GLUCOSE (mg) CONSOMME PAR LES *CELLULES CARDIAQUES* EN FONCTION DE CONCENTRATIONS CROISSANTES D'INSULINE.
(Concentration initiale glucosée : 60 mg).

Séries / µU/ml Insuline	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	m	σ
0	6	7	5	6	8	7	9	7	6	5	7	8	9	5	8	7	6	6	7	6	7	1,2
10	9	10	9	10	8	9	10	9	10	9	10	9	10	8	10	11	7	8	11	8	9	1
20	10	11	10	10	11	11	11	10	10	11	12	10	11	10	11	10	10	10	11	11	11	1,6
50	11	12	13	13	13	13	12	13	13	14	14	13	13	11	12	13	11	12	11	13	12	0,9
100	13	11	12	14	14	12	11	11	15	14	14	13	13	13	13	14	14	13	12	13	13	1,2
500	12	12	13	13	14	13	14	13	15	14	15	12	14	13	11	13	14	13	13	14	13	1,2

TABLEAU IX

GLUCOSE (mg) CONSOMME PAR LES *CELLULES ADIPEUSES*
EN FONCTION DE CONCENTRATIONS CROISSANTES D'INSULINE.
(Concentration initiale glucosée 60 mg).

µU/ml Insuline \ Séries	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	m	σ
0	4	6	5	6	4	6	5	4	3	5	6	7	4	6	6	5	6	5	4	6	5	1
10	9	7	8	11	7	8	9	8	8	7	9	11	9	7	10	7	10	11	8	8	9	1,2
20	11	11	12	13	11	12	13	11	12	12	13	13	13	10	11	13	11	13	12	11	12	1
50	14	19	18	20	18	18	19	21	20	20	19	18	21	20	20	18	19	20	19	20	19	1,5
100	23	26	26	25	27	23	25	27	26	27	22	28	27	23	24	27	24	27	26	24	25	2,1
500	22	27	29	26	25	28	27	22	27	26	25	25	26	23	23	29	29	20	22	25	25	2,6

Afin de faire une comparaison entre les résultats des quatre tableaux précédents, nous avons représenté sur la figure 8 l'évolution du rapport (R) de la consommation du glucose au glucose initial en fonction de la concentration en insuline.

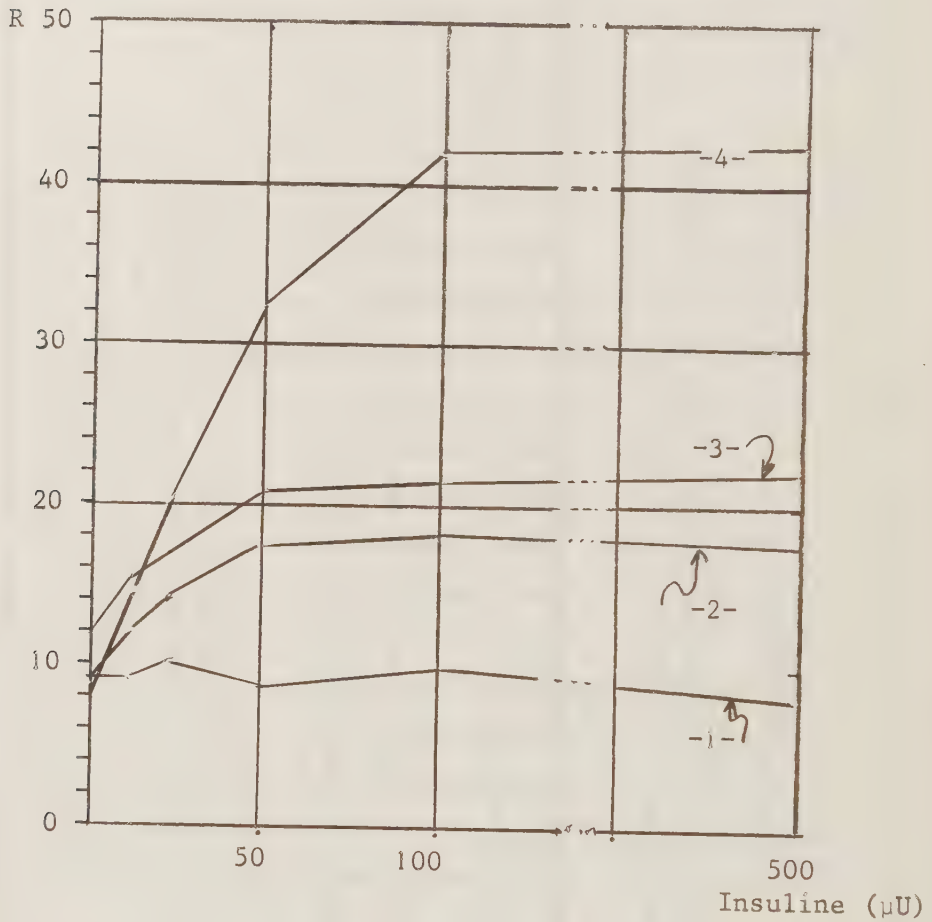


Figure 8 : Glucose consommé (en pour cent) en fonction de doses croissantes d'insuline.
Courbe 1 = cellules rénales
Courbe 2 = cellules musculaires
Courbe 3 = cellules cardiaques
Courbe 4 = cellules adipeuses

L'examen de ce graphique et des tableaux précédents permet plusieurs remarques :

- en l'absence d'insuline dans le milieu d'incubation, la consommation du glucose est pratiquement indépendante de la cellule étudiée.

- Lorsque l'insuline est ajoutée à des concentrations croissantes au milieu d'incubation, une diversité très grande apparait dans les résultats : les cellules rénales semblent peu influencées par la présence d'insuline ; l'augmentation de glucose consommé est du même ordre pour les cellules musculaires et cardiaques ; elle est nettement plus importante pour les cellules adipeuses.

Nous avons cherché la signification, pour chaque type de cellules, de ces différences de consommation. Pour cela, par une étude statistique, nous avons comparé la moyenne des résultats obtenus lorsque le milieu ne contient pas d'insuline avec celles obtenues en présence de doses croissantes d'insuline. Nous avons cherché s'il existe une différence significative entre ces moyennes.

Pour cette étude[c], nous avons appliqué un même test statistique, le "test du signe" (66). Cette méthode est dite non paramétrique car elle ne compare pas les valeurs des variables mais leurs rangs. Elle est valable même si le caractère laplacien de la distribution n'est pas vérifié. En effet, dans nos expériences, le nombre d'échantillons est insuffisant pour une estimation précise de la population. Il nous est donc apparu préférable d'utiliser "le test du signe" qui, sans aucune hypothèse sur la distribution nous permet de comparer très rapidement deux moyennes. Nous rappelons que ce test ne tient compte que du signe des différences entre les deux échantillons appariés à comparer. S'ils sont tous issus d'une même population, la probabilité d'avoir des différences négatives est égale à celle d'avoir des différences positives :

[c] *Nous tenons à remercier Madame BONNICHON, pour l'aide très amicale qu'elle a bien voulu nous apporter.*

probabilité différences > 0 p = 1/2
probabilité différences < 0 p = 1/2
on a affaire à une distribution binomiale.

Si l'on observe, sur les échantillons considérés n différences, dont x sont positives et x' négatives, des tables permettent d'établir si les deux échantillons appartiennent ou non à la même population. Ce test comme tout test non paramétrique a une puissance inférieure à celle des tests classiques mais toute différence significative avec le premier entraîne une différence significative avec les seconds.

En appliquant le "test du signe", nous avons obtenu des différences significatives entre les consommations de glucose sans insuline et avec insuline pour les cellules musculaires, cardiaques et adipeuses quelle que soit la dose d'insuline présente dans le milieu. L'application du test aux cellules rénales nous a conduit à une différence non significative entre les moyennes. Nous avons alors utilisé le test de WILCOXON (68) test non paramétrique plus puissant que le précédent. Nous avons obtenu des différences non significatives pour la plupart des concentrations d'insuline sauf pour une concentration de 50 µU par ml, résultat très paradoxal.

Si au terme de cette étude, nous pouvons affirmer que l'insuline a bien une action sur la consommation en glucose des cellules musculaires, cardiaques et adipeuses, en revanche, il ne nous est pas possible de conclure en ce qui concerne les cellules rénales. Nous avons obtenu dans ce cas les résultats les plus variés mais, n'ayant pas opéré de tests de survie sur ces cellules, nous ne pouvons affirmer d'une part leur bon état métabolique et d'autre part l'absence d'actions enzymatiques au niveau du tissu rénal. Cette étude s'écartant de notre ligne d'intérêt nous avons préféré éliminer l'emploi de ces cellules. Nous comprenons cependant les divergences observées entre plusieurs auteurs sur l'action de l'insuline au niveau rénal (123).

Les cellules musculaires et cardiaques présentent des sensibilités très proches à l'insuline. Pour de faibles concentrations d'insuline (20 µU/ml) le glucose consommé augmente de plus de la moitié de la consommation de base (sans insuline). A partir de 50 µU par ml d'insuline, la consommation tend vers une limite de 18 % pour les cellules musculaires et 22 % pour les cellules cardiaques.

Les cellules adipeuses, comme l'ont remarqué d'autres auteurs (43), se distinguent des précédentes par une bien plus grande sensibilité à l'insuline. En effet si la consommation glucosée de base est identique à celle des cellules précédentes, elle est presque doublée en présence de 10 µU par ml d'insuline et plus que triplée pour 50 µU par ml. Pour les plus grandes concentrations d'insuline, le glucose consommé par ces cellules tend vers une limite d'environ 42 %.

Il est possible de relier les concentrations de l'insuline dans le milieu, en particulier les faibles valeurs allant de 0 à 100 µU par ml, au pourcentage de glucose consommé. Pour ce faire, on utilise un papier semi - logarithmique, on place en ordonnée la concentrations d'insuline et en abscisse le pourcentage de glucose consommé. La courbe qui relie les points peut être assimilée à une droite et peut éventuellement servir à un dosage de l'insulinémie (figure 11). En effet, il suffit d'incuber du sérum avec des cellules adipeuses dans les conditions décrites précédemment, de doser la consommation glucosée et de comparer le résultat obtenu avec une courbe étalon réalisée en même temps avec des doses connues d'insuline.

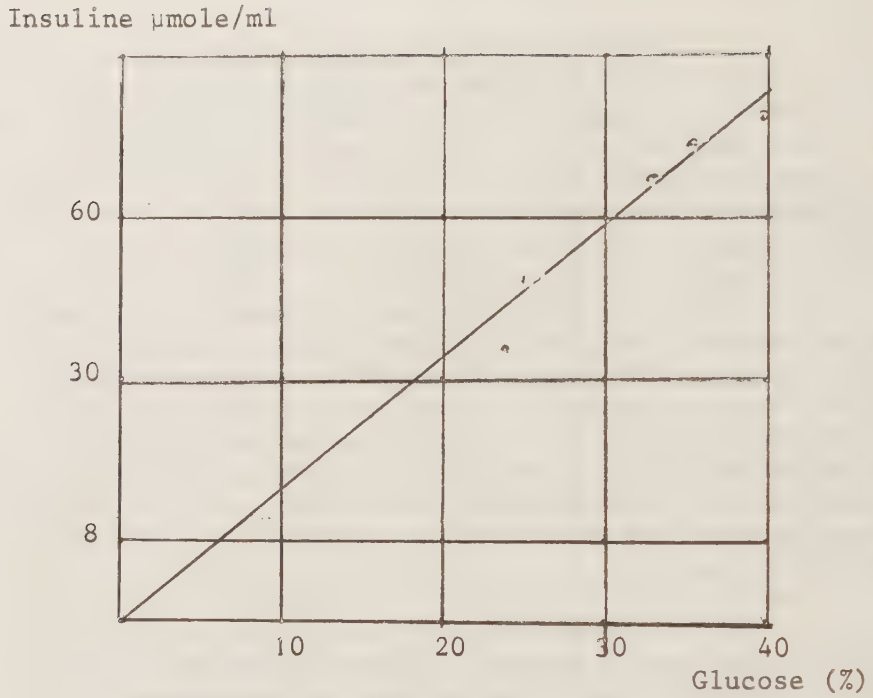


Figure 9 : Concentrations de l'insuline dans le milieu en fonction du pourcentage de glucose consommé.

Remarquons cependant l'intérêt très limité de cette méthode car d'une manière générale l'utilisation des logarithmes écrase toujours une courbe et rend moins visibles les imperfections de la droite.

La très grande sensibilité des cellules adipeuses aux faibles concentrations insuliniques nous a conduit à reprendre plusieurs séries d'expériences avec des cellules de graisse épididymaire de rat. Nous avons étudié deux paramètres influençant la consommation en glucose par ces cellules : durée de l'incubation et concentration initiale du glucose dans le milieu.

Influence de la durée de l'incubation

Deux séries de vingt flacons renfermant tous la même quantité de cellules adipeuses (20 mg), de glucose (60 mg pour 100 ml), l'une sans insuline et l'autre avec 50 µU/ml d'insuline, sont placées au B.M à 37° C. Toutes les quinze minutes, trois flacons de chaque série sont prélevés et le glucose restant dans le milieu est dosé. La valeur moyenne du glucose consommé par les cellules est calculée de la même façon que précédemment. Les résultats sont reproduits sur le tableau X. Nous avons également exprimé la consommation en pourcentage de la quantité initiale de glucose. La dernière colonne verticale du tableau représente la différence entre les pourcentages trouvés en absence et en présence d'insuline. C'est cette différence que nous avons reproduite en ordonnée sur le graphique de la figure 10, et en abscisse nous avons noté la durée de l'incubation correspondante.

TABLEAU X

GLUCOSE CONSOMME PAR LES CELLULES ADIPEUSES EN FONCTION DU TEMPS D'INCUBATION. (Glucose initial : 60 mg).

Incubation (minutes)	Glucose consommé (mg)		Glucose consommé (en %)		Différence (en %)
	0 Ins.	+ Ins.	0 Ins.	+ Ins.	
15	0	1	0	1	1
30	1	2	2	4	2
45	2	4	3	6	3
60	3	6	5	10	5
120	5	14	8	23	15
180	6	16	10	26	16

Glucose consommé

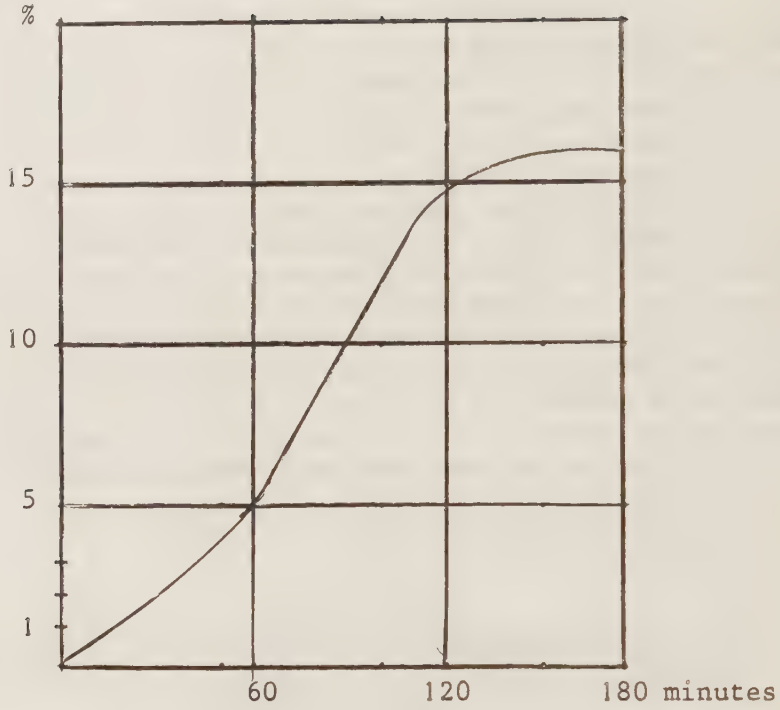


Figure 10 : Influence de la durée de l'incubation sur la consommation en glucose des cellules adipeuses en présence de 50 µU d'insuline.

Nous constatons que pour des incubations inférieures à une heure, le pourcentage de glucose consommé est peu influencé par la présence d'insuline. Au contraire, lorsque la durée de l'incubation dépasse 45 minutes, la différence entre le pourcentage de glucose consommé en présence et en absence d'insuline augmente très rapidement pour atteindre une valeur de 15 % pour deux heures d'incubation. Si l'on prolonge la durée jusqu'à trois heures, on s'aperçoit que l'action de l'insuline n'est pas plus apparente puisque la différence précédente ne dépasse pas 16 %. Il suffit donc d'une incubation de 2 heures à 37° C pour déterminer l'action de l'insuline dans les conditions les plus favorables. Cette condition est réalisée dans nos expériences précédemment décrites.

Influence de la concentration en glucose du milieu

Le protocole expérimental utilisé est le suivant : on prépare deux séries de vingt flacons à incubation contenant la même quantité de cellules adipeuses préparées suivant la technique précédemment décrite. La première série constitue un témoin sans insuline, la deuxième renferme une même concentration insulinique soit 50 µU par ml. Aux deux séries, on ajoute des doses croissantes de glucose allant de 20 mg pour 100 ml à 200 mg pour 100 ml. Comme pour les expériences précédentes, après incubation des flacons pendant deux heures au bain-marie à 37° C, le glucose restant dans le milieu est dosé par la technique automatique au ferricyanure et la consommation glucosée est établie pour chaque échantillon. Nous avons reproduit sur le tableau XI les séries de vingt résultats obtenus. Nous avons calculé la valeur moyenne (m) du glucose consommé pour chaque série (avant dernière colonne verticale du tableau) et exprimé cette valeur moyenne en pourcentage de la quantité de glucose mise en oeuvre (dernière colonne).

Pour rendre ces chiffres plus explicites nous avons représenté, sur la figure 11, le glucose moyen consommé par les cellules lors de l'expérience en absence (courbe 1) et en présence de 50 µU/ml d'insuline (courbe 2). La figure 12 reproduit les mêmes consommations exprimées en pourcentage de la concentration initiale de glucose.

TABLEAU XI

GLUCOSE CONSOMME (mg/100 ml) PAR LES CELLULES ADIPEUSES, EN L'ABSENCE ET EN PRESENCE D'INSULINE (5 mU/100 ml) EN FONCTION DE LA CONCENTRATION GLUCOSEE INITIALE.

Concentration initiale Pour 100 ml		SERIES																				m	m
Glucose (mg)	Insuline (mU)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	0	mg	(%)
20	0	1	0	2	3	3	2	2	1	3	2	1	2	2	1	0	0	2	1	0	0	1,4	7
	5	1	3	4	2	5	0	2	1	2	1	3	5	1	1	2	3	1	0	1	3	2	10
50	0	3	5	5	2	3	2	4	5	2	3	3	4	4	5	2	5	3	5	4	4	4	8
	5	10	14	13	12	12	12	12	13	12	10	15	13	13	12	13	12	10	12	14	15	12	24
80	0	5	8	7	6	8	6	8	7	7	8	5	8	5	7	9	6	5	7	9	6	7	9
	5	12	13	16	17	11	13	12	17	17	15	14	12	16	17	16	13	13	14	17	15	15	18
100	0	7	10	7	9	10	8	10	6	7	9	8	11	6	11	10	7	10	8	10	9	9	9
	5	16	15	17	14	18	16	17	17	15	13	16	16	15	16	16	15	16	16	15	16	16	16
150	0	12	13	12	13	11	14	10	15	14	13	12	11	14	12	11	10	10	11	10	11	12	8
	5	20	19	15	14	10	10	12	20	22	23	16	11	22	21	12	10	25	20	18	20	18	9
200	0	17	16	15	18	16	18	15	18	17	18	15	16	16	15	16	18	16	15	18	15	14	7
	5	22	20	19	22	21	21	18	17	23	24	20	17	19	20	20	20	11	18	20	22	20	10

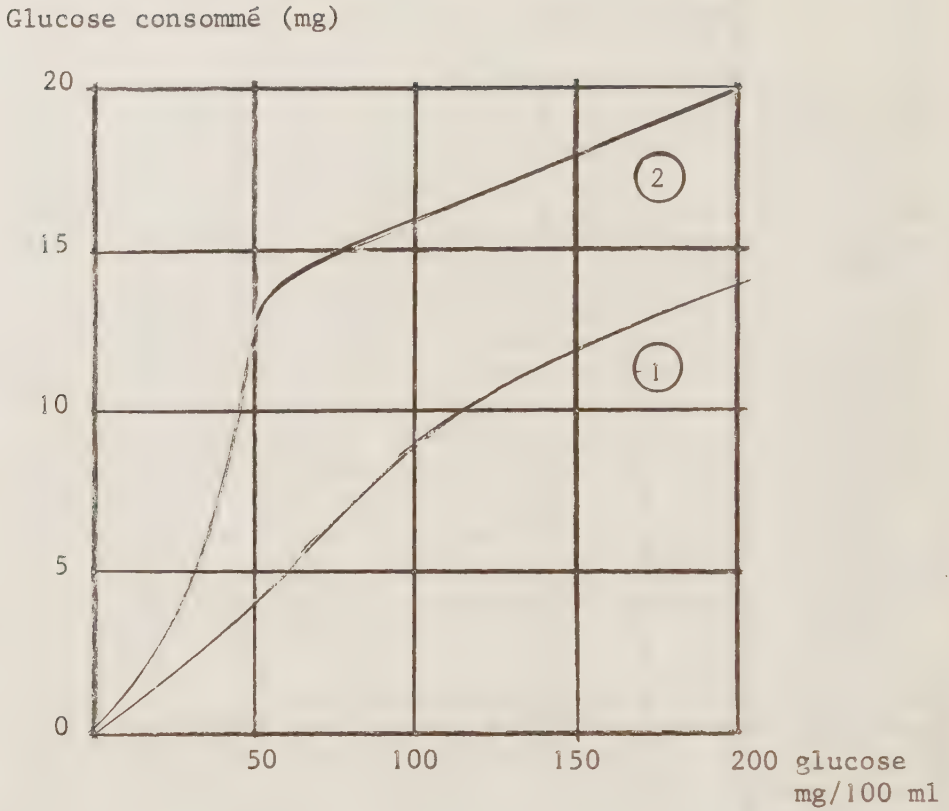


Figure 11 : Glucose consommé (mg/100 ml) par les cellules adipeuses en fonction de la concentration glucosée initiale.
(Courbe 1 : sans insuline)
(Courbe 2 : avec insuline)

D'après la figure 11 nous constatons que la consommation en glucose des cellules adipeuses augmente avec la concentration initiale en glucose que ce soit en l'absence ou en présence d'insuline dans le milieu. Les deux courbes sont cependant très distinctes, la consommation en présence de 50 µU par ml d'insuline étant très supérieure à celle observée en l'absence de l'hormone.

Glucose consommé

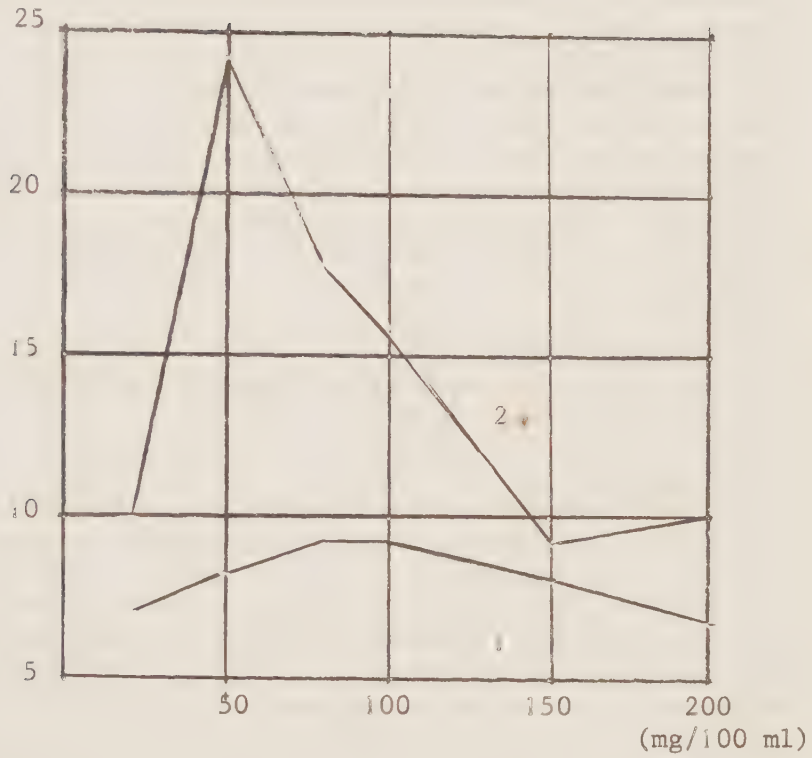


Figure 12 : Pourcentage de glucose consommé par les cellules adipeuses en fonction de la concentration glucosée initiale. (Courbe 1 : sans insuline) (Courbe 2 : avec insuline).

La figure 12 nous donne plus de renseignements. En l'absence d'insuline dans le milieu d'incubation, le pourcentage de glucose consommé par les cellules adipeuses est pratiquement indépendant de la concentration initiale.
En effet, la consommation glucosée se maintient entre 7 et 9 % de la quantité mise en jeu, on observe même, pour des concentrations glucosées supérieures à 150 mg, une diminution légère de la consommation, comme si un excès de glucose détruisait l'équilibre métabolique.

En présence de 50 µU par ml d'insuline, nous observons un phénomène très particulier : le pourcentage de glucose consommé augmente très rapidement jusqu'à une limite de 24 % atteinte pour une concentration glucosée initiale de 50 mg pour 100 ml. Pour des concentrations supérieures, le pourcentage de cette consommation diminue et revient à la valeur initiale de 9 %, très proche des pourcentages observés en absence d'insuline. On doit donc admettre qu'à une certaine dose d'insuline, correspond une concentration optimum de glucose favorisant la consommation des cellules. Ce fait assez paradoxal a déjà été signalé par CROFFORD qui, étudiant la production de gaz carbonique $^{*}CO_2$ à partir de glucose marqué sur des cellules adipeuses, observe un effet insulinique maximum pour une concentration glucosée initiale de 1,25 mM (42).

CONCLUSION

Toutes ces expériences suscitent quelques remarques :

La mise au point d'un dosage de l'insulinémie s'appuyant sur la consommation glucosée des cellules animales est à éliminer. Nous avons voulu réaliser une méthode de dosage simple, précise et rapide et toutes les opérations précédentes sont longues, compliquées et entachées d'erreurs. En effet, la préparation des cellules adipeuses est loin d'être une opération de routine : pour obtenir la quantité de cellules indispensables à une série d'expériences, la graisse épididymaire de trois rats est en moyenne nécessaire, et bien souvent une certaine proportion des cellules obtenues est à rejeter car elles sont métaboliquement inertes. La manipulation des cellules n'est pas facile et bien que l'utilisation de matériel plastique facilite l'opération en évitant la lyse des cellules, on doit tenir compte d'un rendement très faible de la préparation. De plus, au cours de nos très nombreux essais, nous avons constaté que, malgré toutes les précautions prises, certaines séries d'expériences se terminaient par des résultats aberrants que nous n'avons pu expliquer.

Nous avons pu faire également certaines observations sur le choix des animaux. Les meilleurs résultats

ont été obtenus en utilisant des animaux pesant au moins 250 grammes et au plus 300 grammes. Les animaux plus petits fournissent moins de graisse épididymaire. Il faut donc utiliser un plus grand nombre d'animaux pour une même série d'expériences et nous avons remarqué que les résultats sont plus dispersés lorsque le nombre d'animaux employés augmente. Chez les animaux de plus de 300 grammes nous avons constaté une absence de réponse ou tout au moins une réponse très faible à la stimulation par l'insuline. Ces rats étant en général plus âgés, cela peut être dû aux modifications de l'activité métabolique des tissus en fonction de l'âge.

Pourtant, même en utilisant des rats de même poids, de même âge, provenant du même élevage et nourris de façon identique, il est assez fréquent de constater pour les diverses concentrations d'insuline, une consommation de glucose non supérieure à celle obtenue dans le flacon témoin sans insuline. Une explication possible réside dans le fait que les cellules adipeuses utilisées sont des cellules provenant d'êtres soumis à une régulation pancréatique ; chez l'animal vivant, ces cellules sont soumises à l'influence d'actions insuliniques. Il faudrait admettre que l'insuline se fixe in vivo sur les cellules sensibles et n'est pas éliminée lors du prélèvement du tissu. De ce fait, aucun site actif de la membrane ne serait disponible pour l'insuline ajoutée in vitro.

En tenant compte de cette objection, nous avons repris nos expériences en utilisant des cellules provenant d'organismes non soumis à une régulation pancréatique. Pour réduire également le temps de préparation de ces cellules nous nous sommes adressée à des êtres unicellulaires, les levures. Nous avons employé une même souche : "Saccharomyces cerevisiae H 60", responsable de la fermentation alcoolique, mais de provenances diverses :

- levures de vin, obtenues lyophilisées ("désséchées") auprès du Service des fermentations de l'Institut Pasteur.

- Levures de bière, prises en phase de croissance active dans les moûts de brasseries°.

- Levures utilisées en pharmacie, à l'état stabilisé, préparées par plusieurs laboratoires°°.

Dans un premier temps nous avons procédé à une régénération des levures à l'état lyophilisé pour employer uniquement des organismes en phase de croissance active. Nous avons réalisé une incubation à 25° pendant 24 heures au moins dans un milieu sucré contenant des sels nutritifs°°°.

Toutes les levures sont alors traitées de la même façon : les cultures sont centrifugées, le culot prélevé et les levures remises en suspension dans un volume déterminé de tampon Krebs-Ringer. Nous avons repris le protocole expérimental décrit page 80 pour les cellules animales et nous avons mesuré la consommation glucosée des levures en présence de concentrations croissantes d'insuline dans le milieu d'incubation.

Nous n'avons pas reproduit ici l'ensemble des résultats obtenus sur les diverses séries d'expériences, résultats qui s'avèrent extrêmement variables. Nous avons seulement indiqué sur le tableau XII, pour chaque série d'expériences, la valeur moyenne de glucose consommé, exprimé en pourcentage de la concentration initiale et l'écart type correspondant à cette moyenne.

°*Brasseries "La Meuse" -Bordeaux.*

°°*En particulier "Stabilevure" des laboratoires Millot et "Ultralevure" de Biocodex.*

°°°*Sels fournis par l'Institut Pasteur.*

TABLEAU XII

GLUCOSE CONSOMME (EN POUR CENT) PAR LES LEVURES EN FONCTION DE CONCENTRATIONS CROISSANTES D'INSULINE.

levures \ mU/ml Insuline	0		10		20		50		100		500	
	m	σ	m	σ	m	σ	m	σ	m	σ	m	σ
de vin (I. Pasteur)	32	6	31	6	27	14	30	6	29	6	30	6
de bière (bras. La Meuse)	46	7	45	7	47	5	44	6	43	7	48	5
Stabilevure (Millot)	23	3	25	5	24	3	23	3	24	4	22	2
Ultralevure (Biocodex)	24	3	24	3	24	4	25	4	24	3	23	3

A l'examen de ce tableau nous remarquons tout de suite la dispersion des résultats, signalée par les taux élevés des écarts-types. Les valeurs des moyennes obtenues sont peu recevables et l'on ne peut tirer de conclusion vraiment rigoureuse.

Nous constatons cependant que les consommations glucosées des levures sont bien supérieures à celles obtenues pour les cellules animales. Ces organismes sont donc grands utilisateurs de glucose et pourtant ne sont pas du tout influencés par la présence de concentrations plus ou moins élevées d'insuline. Ces résultats se retrouvent quelle que soit l'origine des levures utilisées. On peut donc dire, malgré la valeur relative des résultats, que les levures sont bien gluco-dépendantes mais non insulino-dépendantes.

Une remarque s'impose : le glucose qui disparaît pénètre dans le milieu intra-cellulaire de la levure où il est métabolisé. Le système enzymatique de cet organisme permet donc la glycolyse, comme pour une cellule animale. Or l'insuline n'agit pas sur la levure, donc l'effet essentiel de l'insuline au niveau du glucose ne concerne pas le métabolisme intracellulaire du sucre. L'action de l'insuline au niveau du passage à travers la membrane des cellules animales se trouve confirmée.

Nous avons vu cependant que toutes les cellules animales ne sont pas sensibles à l'action insulinique. Toutes les membranes ne se comportent pas de la même façon vis à vis de l'hormone pancréatique et l'on peut définir des membranes insulino-dépendantes et insulino-indépendantes. Il apparaît intéressant d'étudier ces membranes ainsi que la relation pouvant exister entre insuline, membrane et glucose.

C H A P I T R E III

INTRODUCTION AU MODELE MOLECULAIRE DE L'INSULINE

Nos travaux ont montré que l'insuline favorise l'utilisation du glucose par certaines cellules animales comme les cellules musculaires, cardiaques et adipeuses. Ces résultats confirment ceux de plusieurs auteurs (159, 176). RENOLD (155) a classé les cellules animales en deux catégories : les cellules sensibles à l'insuline comme le diaphragme, le coeur, les tissus graisseux, les muscles et les cellules insensibles à l'insuline comme le cerveau et la rétine. Connaissant la très grande importance de la concentration du glucose intracellulaire pour la vie du tissu cérébral, on comprend aisément que ce dernier ne soit pas sous la dépendance d'une régulation hormonale. Les cellules présentent donc, selon leur nature, des comportements différents vis à vis de l'hormone pancréatique.

Il est actuellement bien établi que l'action insulinique sur les cellules "sensibles" s'exerce, en premier lieu, au niveau du passage à travers la membrane de substances aussi diverses que le glucose, les acides aminés et les acides gras. Pour expliquer ce phénomène, plusieurs facteurs peuvent intervenir :

- la structure des membranes
- l'action de l'insuline au niveau de ces membranes
- la dépendance entre la structure moléculaire de l'insuline et son activité biologique.

Nous allons envisager successivement chacun de ces points qui nous conduiront à établir un modèle de la structure de l'insuline dans sa forme active. Nous proposerons alors un mécanisme d'action sur le passage transmembranaire du glucose en particulier, des acides aminés et acides gras en général.

1 - STRUCTURE DES MEMBRANES

La membrane plasmatique d'une cellule animale est une surface d'une certaine épaisseur réalisant une "barrière" entre la cellule et le milieu extérieur.

De par sa fonction, elle se présente schématiquement comme un filtre poreux soumis à diverses forces :

- les forces dites "passives", liées d'une part aux gradients de concentrations qui tendent à assurer la dilution des solutions concentrées, d'autre part aux gradients électriques qui permettent une sélection entre les molécules diversement chargées.
- les forces dites "actives", liées à des réactions chimiques dans la membrane ou à l'intervention d'hormones. Ce transport actif est objectivé en premier lieu par le passage du glucose dans la cellule.

La première structure moléculaire d'une membrane a été proposée par DAVSON et DANIELLI (46) pour les globules rouges. Ces auteurs ont établi un modèle comprenant une couche bimoléculaire de lipides placée entre deux couches de protéines. Dans chaque couche lipidique, les chaînes d'acides gras sont orientées de telle façon que les groupements polaires se trouvent tous en regard des protéines avec lesquelles ils se lient par interactions électrostatiques. Un schéma de cette structure est représenté sur la figure 13.

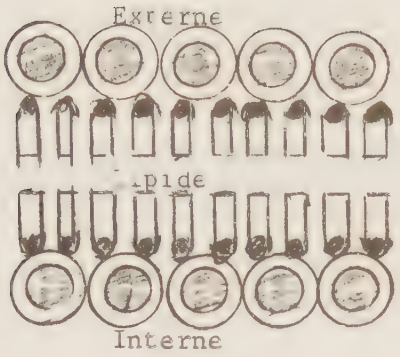


Figure 13 : Modèle de structure de membrane selon DAVSON et DANIELLI (46).

Par la suite ces mêmes auteurs apportèrent des modifications à leur modèle en tenant compte du fait que la membrane est aussi perméable aux molécules hydrophiles qu'aux molécules hydrophobes. Pour expliquer cette propriété, DANIELLI (47) admet, à la surface des membranes, la présence de pores dont les parois seraient constituées de protéines chargées électriquement.

L'étude au microscope électronique de diverses membranes a permis à ROBERTSON de généraliser ce modèle en développant sa théorie sur l'unité de membrane, "Unit membrane", qui est encore admise actuellement. Pour lui, la structure de base de toute membrane résulterait de l'arrangement de couches de phospholipides entre les couches de protéines, les chaînes aliphatiques des acides gras se trouvant réunies au centre. Nous avons reproduit sur la figure 14 le schéma de "l'Unit Membrane". Cette structure "tripartite" commune explique l'épaisseur constante d'environ 70 à 100 A relevée pour toutes les membranes.

Il y a quelques années, des doutes ont été émis sur la validité du modèle lipidique de ROBERTSON et

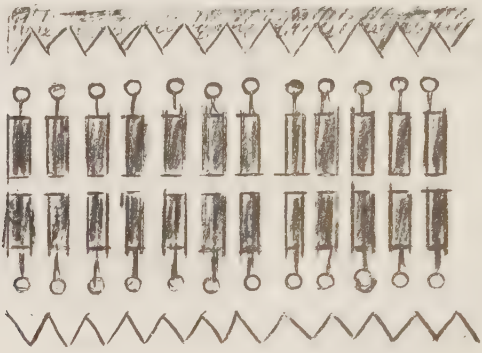


Figure 14 : Structure de "l'Unit Membrane" de ROBERTSON.

pour SJÖRSTRAND (172) la structure de base de toute membrane résulte de l'arrangement en deux dimensions de "subunités" de complexes lipoprotéiques en présence de couches discontinues de lipides. Cette théorie dite "alternative" reste encore du domaine de l'hypothèse bien que s'appuyant sur des observations au microscope électronique. Cependant, on a pu montrer que la configuration β des protéines de "l'Unit Membrane" décrite par ROBERTSON, n'est pas toujours vérifiée et l'on peut trouver des protéines sous la forme d'hélice α.

Une conception plus nuancée de la structure des membranes se fait jour et actuellement ces dernières ne sont plus considérées en tant que barrières inertes mais comme des systèmes dynamiques. Les associations moléculaires entre les lipides et protéines sont représentées presque exclusivement par des forces électrostatiques entre les groupements chargés de protéines ou des interactions entre les chaînes hydrocarbonées des lipides et les zones apolaires des protéines. Les actions entre composés adjacents sont facilitées par le mouvement oscillatoire des molécules.

La structure des membranes de toutes les cellules semble donc répondre à un même schéma. En fait, les propriétés de perméabilité sont différentes et nous avons constaté l'existence de cellules sensibles à l'action de l'insuline et de cellules non sensibles. Ces différences pourraient s'expliquer par des variations au niveau de la composition chimique des membranes. On doit noter que, jusqu'à présent, peu d'études ont été faites sur les cellules animales, la plupart des travaux concernant surtout les membranes bactériennes. Seule a été bien étudiée la composition des membranes de gaine de myéline, d'érythrocytes, de membranes microsomiales et mitochondriales de foie de rat (180). Dans tous ces cas, les proportions des lipides et celles des protéines ont été mesurées et se situent en moyenne aux environs de 40 % de lipides pour 60 % de protéines (181), en notant cependant un pourcentage lipidique supérieur pour les membranes des gaines de myéline. L'analyse des lipides fait apparaître de façon constante des phospholipides et du cholestérol quel que soit le type de cellule envisagé. Remarquons cependant que les membranes étudiées ne concernent pas les cellules animales que nous avons définies précédemment comme sensibles à l'insuline.

La composition protéique a été moins étudiée. Cependant d'après les travaux de TRIA et BARNABEI (182) nous constatons une grande richesse en acides aminés non polaires aliphatiques et aromatiques (50 % en moyenne). Suivant le type de cellules, les différences semblent exister, concernant les acides aminés soufrés (cystéine, cystine) dont la proportion passe de 0,3 % pour la myéline à 10 % pour les mitochondries.

Dans notre laboratoire, un certain nombre de travaux, portant sur ce sujet, a été réalisé par RENAUD (87). Cet auteur a préparé des membranes cellulaires de tissu musculaire, adipeux, cérébral et diaphragme de rat suivant la technique de NEVILLE (136) modifiée par TAKEUCHI et TERAYAMA (180). Les lipides (cholestérol, triglycérides, phospholipides et acides gras libres) sont extraits et analysés par les techniques courantes de dosage. La fraction protéique recueillie est analysée, après hydrolyse acide, par chromatographie sur colonne des acides aminés (méthode de MOORE et STEIN).

Actuellement, il n'est pas possible de donner des résultats complets, mais les premiers travaux de RENAUD sur le tissu cérébral et musculaire permettent de mettre en évidence un contenu lipidique d'environ 40 %, analogue à celui des membranes microsomiales et mitochondriales de foie de rat. Signalons également la richesse de ces membranes en phospholipides. L'analyse des acides aminés ne permet pas encore de déceler une différence significative entre les diverses membranes. Des recherches sont en cours sur le nombre des fonctions thiols.

II - ACTION DE L'INSULINE AU NIVEAU DE LA MEMBRANE CELLULAIRE

L'action de l'insuline au niveau de la perméabilité cellulaire est actuellement bien admise. Cette théorie soutenue dès 1950 par LEVINE (110) puis par de nombreux auteurs avec des travaux sur le muscle strié (141), le coeur (134), le tissu adipeux (197), concerne essentiellement le transport des sucres dans l'espace intracellulaire. Un fait constant est à remarquer : l'insuline n'agit que sur une cellule intacte et non sur des homogénats de tissu.

Cependant le mécanisme intime du transport, le lieu et mode d'action exact de l'insuline sont encore mal connus et l'on ne peut actuellement parler que d'hypothèses :

L'existence dans la membrane d'un "transporteur" semble bien acceptée. La nature de ce "transporteur" que l'on appelle perméase n'est pas encore éclaircie : lipoprotéine, phospholipide ou peptide. L'interprétation du mécanisme d'action de l'insuline à la lumière de cette perméase conduit à des conclusions légèrement différentes. D'après CROFFORD et RENOLD (143) l'insuline augmenterait l'affinité du glucose pour le transporteur. Pour NARAHARA (135) l'insuline augmenterait la vitesse avec laquelle le complexe transporteur-glucose traverse la membrane. Pour d'autres, un mécanisme de déphosphorylation interviendrait (105, 145).
LEVINE (11) en 1965 et KIPNIS (95) ont montré la difficulté de comprendre, à la lumière de l'hypothèse du transporteur, l'action marquée de l'insuline sur le transport de molécules aussi différentes que le glucose, le galactose, l'acide aminoisobutyrique, divers acides aminés et acides gras. En raison de cette multiplicité, on peut admettre que l'hormone modifie la perméabilité cellulaire de façon non spécifique.

La théorie de RANDLE et SMITH (150) suggère que les membranes des cellules sensibles à l'insuline possèdent une "barrière" à l'entrée du glucose fermée par application constante d'énergie sous forme d'ATP provenant des réactions énergétiques intracellulaires. Cette "barrière" se comporte, d'après les auteurs, comme une porte battante maintenue close par application d'une pression sur un côté. L'insuline agirait en empêchant la production de cette pression. Nous avons reproduit sur la figure 15 le schéma de cette hypothèse. Trois étapes sont représentées :

- sur le premier tableau, les réactions génératrices d'ATP sont supprimées par des inhibiteurs tels que les ions cyanure. La porte battante (membrane) s'ouvre et laisse pénétrer le glucose.
- sur le second tableau, l'ATP intracellulaire maintient la membrane imperméable au glucose,
- sur le troisième tableau, l'insuline extracellulaire agit par un mécanisme inconnu et inhibe l'action de l'ATP. La porte s'ouvre et le glucose pénètre.

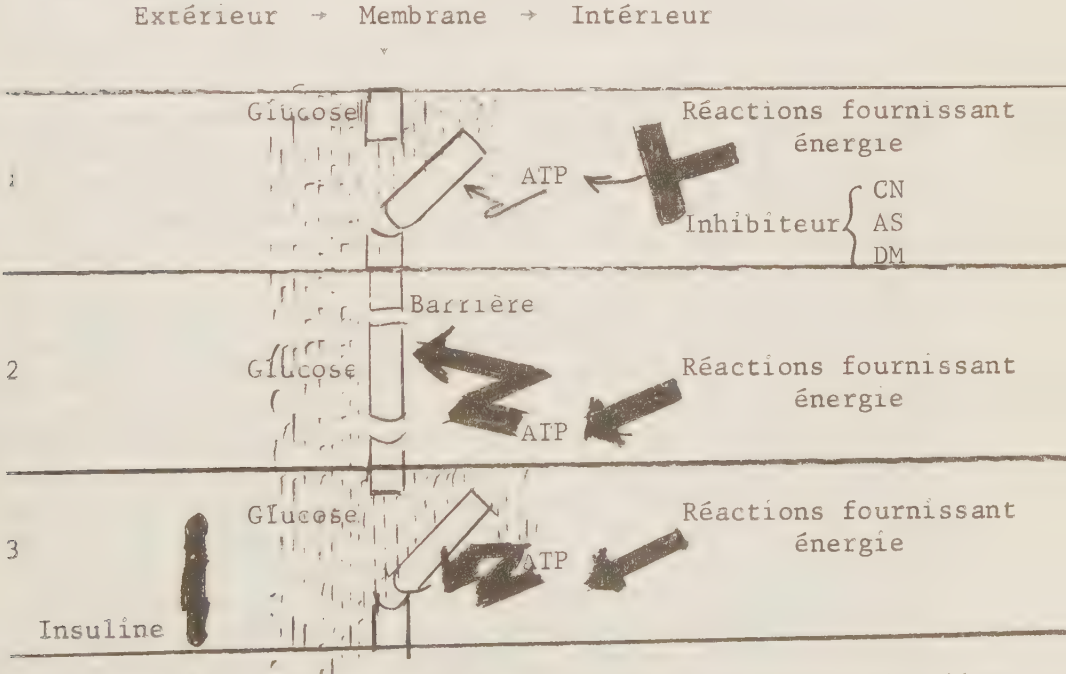


Figure 15 : Schéma de la théorie du mode d'action de l'insuline sur le transport du glucose. (RANDLE) (150)

Les expériences de RODBELL (159) en 1966 sur les cellules adipeuses isolées permettent de rapprocher l'action de l'insuline sur la membrane de l'action d'enzymes protéolytiques telles que la phospholipase A et la phospholipase C. Ces deux enzymes, capables de catalyser l'hydrolyse des phospholipides, reproduisent, à faible concentration, l'action de l'insuline vis à vis du transport de glucose. A forte concentration ils détruisent la membrane. Ces résultats sont surtout obtenus sur des cellules adipeuses isolées de rat préparées par traitement à la collagénase.

Les travaux récents de KUO (100) mettent en évidence l'action insulinique de certains produits, ions arsenite en particulier. De même KONO (96) rapporte que des cellules adipeuses incubées avec de la trypsine ou de la papaïne ne sont plus sensibles à l'action de l'insuline tandis que par action de la collagénase il n'y a pas de perte de sensibilité. Cette action de la trypsine n'est due ni à une destruction de l'hormone, ni à une digestion exagérée des cellules.

L'analogie des effets de l'insuline avec ceux d'agents à action protéolytique sur la membrane permet de penser que l'insuline agit au niveau des protéines de surface. Cette hypothèse s'accorde avec la théorie de STADIE (177) qui dès 1954 parle d'un mordançage de la paroi par l'insuline. Mais le mécanisme exact est encore obscur.

Certains points sont acquis : l'insuline se fixe au niveau de la surface cellulaire par l'intermédiaire d'une réaction d'échange entre les ponts disulfures de l'insuline et les récepteurs thiols de la membrane (31).
En effet par mesure des groupements thiols d'un hémidiaphragme avant et après action de l'insuline une diminution de l'ordre de 20 % a pu être observée (22). Le blocage des groupements thiols de la membrane par des inhibiteurs tels la -N-éthylmaléinimide ou l'iodoacétate supprime l'action de l'insuline (54). De plus l'ocytocine qui présente une structure primaire très voisine de l'insuline avec deux ponts disulfures possède la même action vis à vis de cellules adipeuses isolées (187).

Selon RODBELL (160), l'insuline agirait au niveau de récepteurs protéiques de la membrane en provoquant des altérations de la structure et par là même des modifications de la perméabilité.

III - RAPPORTS ENTRE L'ACTION DE L'INSULINE ET SA STRUCTURE

La réaction d'échange thiol-disulfure qui aurait lieu entre les récepteurs de la membrane et l'insuline implique l'intervention des ponts disulfures de la molécule hormonale. En effet, la rupture de ces liaisons entraîne la perte de l'activité biologique (DU VIGNEAUD (186)) et tous les réactifs des groupements thiols annulent les effets de l'insuline vis à vis du transport des sucres en particulier. Cependant, la perte de l'activité biologique n'est pas en rapport avec la quantité de ponts disulfures rompus. En effet, pour 10 % de réduction de ces liaisons, LENS et NEUTELINGS (109) ont trouvé une diminution de l'activité biologique de 85 %. Puisque la molécule d'insuline renferme trois ponts, il semble bien qu'un seul soit vraiment indispensable à l'activité.

L'importance des liaisons disulfures a conduit à rechercher le ou les sites actifs de la molécule. De nombreux travaux ont été entrepris. Nous ne les détaillerons pas mais nous allons essayer de regrouper les principaux résultats :

- la comparaison des structures primaires de l'insuline de diverses espèces animales, en particulier de mammifères, met en évidence des différences portant principalement sur la partie de la chaîne A comprise à l'intérieur du pont disulfure interne *A6 - A11* et sur le dernier acide aminé de la chaîne B en *B30*. L'activité biologique étant la même, on pourrait penser que la partie active de la molécule se trouve dans la fraction commune à toutes les insulines. En fait, la détermination de la structure primaire d'insuline d'un plus grand nombre d'espèces montre une importante diversité. Les insulines de poisson diffèrent de l'insuline bovine par vingt acides aminés placés sur la chaîne A (*A6 à A11 et A12 à A18*) et sur la chaîne B (*B1 à B5*).

Il est même plus surprenant de constater que l'insuline de cobaye se distingue par dix sept acides aminés situés aussi bien sur la chaîne A que la chaîne B. Or son activité biologique est la même, bien qu'elle soit hautement antigénique.

L'importance relative des divers acides aminés dans les deux chaînes de l'insuline a été encore mieux étudiée par WEBER et ses collaborateurs (192-195). Depuis quelques années, ils synthétisent des molécules d'insuline possédant de légères modifications sur les chaînes d'acides aminés et ils testent leur activité.

Pour éviter une énumération qui pourrait être fastidieuse, nous avons préféré résumer sur le tableau XIII les résultats obtenus par ces auteurs.

Dans la partie centrale, nous avons reproduit la structure primaire de l'insuline bovine, déjà précisée page 17. De part et d'autre de cette formule, nous avons indiqué en face de chaque acide aminé de la chaîne A (colonne de gauche du tableau) et de la chaîne B (colonne droite) les modifications que l'on peut apporter à la séquence des acides aminés, sans perte d'activité biologique. Les quelques termes qui n'ont pu être remplacés sans diminution de l'action de la molécule sont indiqués par le terme "*indispensable*". Lorsque aucune information n'a pu être recueillie, nous avons laissé un blanc.

TABLEAU XIII

IMPORTANCE RELATIVE DES DIVERS ACIDES AMINES DANS LA MOLECULE D'INSULINE.

	VARIATIONS CHAINE A	CHAINE A	CHAINE B	VARIATIONS CHAINE B
1	*indispensable*	(NH_3^+) Gly	Phe (NH_3^+)	*non indispens.*
2	Val, Ileu	Ileu	Val	ala
3	leu	Val	Asp (NH_2)	Lys, Ala, Ser
4		Glu	Glu (NH_2)	Ala, Ser, Lys
5	Glu,	(NH_2) Glu	His	Arg,
6	*indispensable*	S—Cys	Leu	
7	*indispensable*	Cys—S—S—Cys		*indispensable*
8	Thr, His	Ala	Gly	
9	Gly, Ala,	Ser	Ser	Ala,
10	Thr, Ileu, Pro	Val	His	Asp (NH_2)
11	*indispensable*	S—Cys	Leu	
12	Thr, Ala,	Ser	Val	
13	Arg, Ile,	Leu	Glu	
14	His, Phe	Tyr	Ala	Thr,
15	Glu,	(NH_2) Glu	leu	
16		Leu	Tyr	*indispensable*
17		Glu	Leu	Ser,
18	Ala, Ser	(NH_2) Asp	Val	
19	Phe,	Tyr	S—Cys	
20	*indispensable*	Cys—S	Gly	Glu (NH_2)
21	*indispensable*	(NH_2) Asp	Glu	Asp
22			Arg	Asp
23			Gly	
24			Phe	
25			Phe	*indispensable*
26			Tyr	
27			Thr	Ala, Ileu, Ser
28			Pro	Ser,
29			Lys	Met,
30			Ala	Thr, Ser, Asp

- Les modifications chimiques de l'insuline naturelle ont permis de préciser que les réactions d'estérification ou de substitution portant sur les groupements hydroxyles, aminés ou carboxyles des chaînes latérales de l'insuline n'entraînent pas de perte d'activité sauf si les substituants sont de très grosses molécules et dans ce cas la perte d'activité est due à l'encombrement stérique (55, 58) ou sauf si la substitution est très forte (85) : pour dix atomes d'iode fixés sur la molécule, l'activité de l'insuline disparait tandis que pour un atome d'iode, aucune modification n'est observée. Les travaux de FRAENKEL-CONRATT (58) établissent cependant que la fixation d'atomes d'iode sur les restes de tyrosine entraîne une perte de l'activité biologique.

- Les expériences d'hydrolyse ménagée de la molécule (80, 137, 103) ont permis de tester l'importance de certains polypeptides de la chaîne A ou de la chaîne B. L'action de la leucine-amino-peptidase sur une insuline privée de zinc enlève les cinq premiers termes (*A1-A5*) de la chaîne A ainsi que les six premiers (*B1-B6*) de la chaîne B. Plus de la moitié de l'activité biologique subsiste. On peut donc supposer que les premiers termes des deux chaînes ne sont pas indispensables. Cet essai est critiquable car nous avons vu que le glycocolle en A1 était indispensable (tableau XIII).

L'hydrolyse trypsique de la molécule provoque une rupture des liaisons peptidiques entre les acides aminés 22 et 23 de la chaîne B et détache le dernier acide aminé *B30*. A partir de l'insuline bovine on obtient donc : de l'alanine *B30* et un heptapeptide formé par la séquence suivante :

-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-
B22 *B29*

le reste de la molécule d'insuline ne possède plus que 15 % de l'activité biologique initiale tant in vivo qu'in vitro d'après NICOL (137) et moins de 4 % d'après YOUNG et CARPENTER (206) qui ont repris ces travaux en purifiant les produits obtenus par chromatographie sur colonne. L'heptapeptide est lui aussi inactif (moins de 0,1 % de l'activité initiale).

Que peut-on conclure ? aucun groupement chimique ne possède de réactivité particulière pour que l'on puisse lui accorder un rôle en ce qui concerne l'activité biologique et il semble que l'existence d'un site actif soit à rejeter. L'importance d'une chaîne, chaîne B en particulier, a été avancée par LANGDON (103). Cet auteur formule même l'hypothèse que la chaîne B serait le principe actif de la molécule, l'insuline avec ses deux chaînes étant en quelque sorte une prohormone. Ces résultats ont été très contreversés en raison de la présence lors des expériences, d'impuretés constituées par de l'insuline intacte. DIXON (48) affirme au contraire que les deux chaînes isolées n'ont aucune action. Il semble donc bien évident que l'activité biologique de l'hormone pancréatique résulte d'une configuration générale de la molécule, donc de sa structure dans l'espace. Les substitutions d'acides aminés permises sont celles qui n'altèrent pas cette structure.

Nous avons déjà envisagé dans notre première partie, les diverses hypothèses sur la structure secondaire de l'insuline et les objections qui s'adressent à chacune d'elles. Le modèle le plus communément admis est celui proposé par LINDLEY et ROLLET (115) et représenté sur la figure 16.

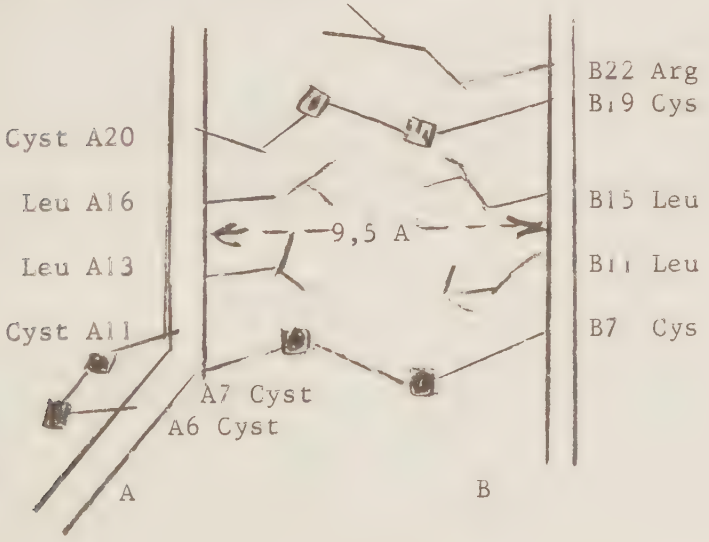


Figure 16 : Schéma de la structure proposée par LINDLEY et ROLLET (115).

Rappelons que pour ces auteurs, les deux chaînes d'un monomère d'insuline, de poids moléculaire moyen 6000, seraient disposées en hélice α. La chaîne A se composerait d'une hélice α gauche pour la séquence des acides aminés *A1* à *A6* et d'une hélice α droite pour le reste de la chaîne. Le changement de sens permettrait la formation du pont disulfure interne de la chaîne en *A6* - *A11*. La chaîne B se disposerait également en hélice α droite.

Nous avons également constaté que cette théorie se heurte aux résultats de mesure de l'hélicité de la molécule par dispersion optique rotatoire. Ces expériences sont réalisées sur de l'insuline intacte contenant ou non du zinc dans sa molécule et sur des peptides obtenus après action de la trypsine sur l'insuline c'est à dire, comme nous l'avons vu page 114, un heptapeptide (fraction de la chaîne B de *B23 à B29*) et un peptide constitué par le reste de la molécule d'insuline (chaîne A et chaîne B de *B1 à B22*). Les résultats montrent peu de différences entre l'insuline intacte et l'insuline privée de la séquence *B23 - B30*. On note seulement une diminution de la proportion de structure β. L'heptapeptide *B23 - B29* possèderait donc cette structure dans la molécule initiale. Les mesures du contenu en hélice α de la molécule varient considérablement avec le solvant utilisé (28). En solution aqueuse, le pourcentage d'hélicité mesuré laisse apparaître une valeur de 30 % au lieu des 100 % que l'on pourrait attendre d'après la théorie de LINDLEY. Pour tenir compte de ces expériences, nous pouvons donc penser que l'insuline possède une structure différente de celle proposée par LINDLEY, tout au moins dans certaines conditions.

C H A P I T R E IV

MODELE MOLECULAIRE DE L'INSULINE

Bien qu'actuellement le modèle le plus couramment admis concernant la structure tridimensionnelle de l'insuline soit celui de LINDLEY et ROLLET, il ne nous paraît pas correspondre à la structure de la forme biologiquement active. En effet, et mis à part les critiques concernant la présence plus ou moins grande d'hélice α (page 116), ce modèle ne tient pas compte des conditions essentielles à l'activité, soit :

- l'importance relative des ponts disulfures,
- le rôle du peptide formé par les huit derniers acides aminés de la chaîne B,
- le rôle de l'insuline sur le transport de substances aussi différentes que glucose, acides gras et acides aminés.

Ces objections nous incitent à proposer une nouvelle structure de l'insuline qui permette d'expliquer d'une manière logique, le passage de molécules du milieu extra-cellulaire au milieu intra-cellulaire.

I - THEORIE DU MODELE

Elle tient compte des remarques précédentes :

1°) Importance relative des ponts disulfures dans la liaison insuline - membrane.

Nous avons vu page 111, l'importance des liaisons disulfures sur l'activité hormonale. Les molécules de cystine sont absolument nécessaires à l'activité de l'insuline. On peut donc penser qu'elles conditionnent le maintien de la structure de la molécule. Nous avons aussi remarqué que les trois ponts disulfures n'ont pas la même importance puisqu'une faible réduction ne détruisant qu'un pont suffit à éliminer pratiquement toute l'activité hormonale. L'identification du pont responsable n'est pas faite.

Rappelons que, dans la molécule d'insuline, il y a un pont "interne" sur la chaîne A entre les cystéines *A6 et A11*, et deux ponts "externes" entre les deux chaînes placés au niveau des cystéines *A7-B7 et A20-B19*. Si nous reprenons le tableau XIII, page 113 et analysons les séquences des acides aminés proches des ponts disulfures, nous constatons que le pont interne (*A6-A11*) est entouré de séquences d'acides aminés peu spécifiques (*A1 à A5, A7 à A10, A12 à A15*). En effet, les premiers termes de la chaîne A depuis l'isoleucine (*A2*) jusqu'à la glutamine (*A5*), le tripeptide Ala (*A8*)-Val (*A10*) et le groupement Ser (*A12*)-Glu N (*A15*) ont pu être remplacés sans modifier l'action biologique. Le pont externe (*A7-B7*) peut faire l'objet des mêmes remarques, puisque les premiers termes de la chaîne B (*B1 à B6*) ne sont pas spécifiques.

Le troisième pont, situé entre les cystéines *A20 et B19* présente deux singularités :

- d'une part il est en position subterminale en ce qui concerne la chaîne A, donc à première vue facilement accessible. L'acide aminé terminal de la chaîne A (*A21*) est l'asparagine qui a été trouvée indispensable à l'activité biologique de l'insuline. Elle ne peut être remplacée. Seul son groupement amide peut être supprimé (138).

- d'autre part, l'extrémité du pont disulfure placé sur la chaîne B (cystéine *B19*) est suivie d'un polypeptide de onze acides aminés parmi lesquels un heptapeptide indispensable, mis en évidence par hydrolyse trypsique de l'insuline.

La position de ce dernier pont nous conduit à supposer que les réactions de réduction le touchent en premier lieu. C'est donc sa destruction qui serait responsable de la perte d'activité constatée par DU VIGNEAUD. De ce fait, nous émettons l'hypothèse que la liaison entre insuline et membrane se fait au niveau du pont considéré.

2°) Importance de l'heptapeptide Gly (*B23*) - Lys (*B29*).

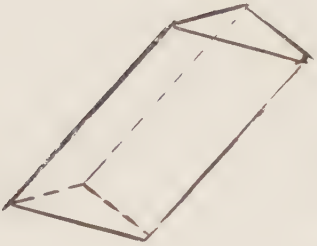
L'hydrolyse trypsique de la liaison Arg (*B22*)-Gly (*B23*) libère un heptapeptide (*B23 - B29*), l'alanine (*B30*) et entraîne une perte d'activité pour la molécule restante. Pourtant, d'après le tableau XIII, nous constatons que la plupart des acides aminés constituant cette séquence ne sont pas indispensables. On a pu remplacer la thréonine (*B27*), la proline (*B28*), la lysine (*B29*) et l'alanine (*B30*). Seuls restent plus essentiels les phénylalanines (*B24 et B25*) et la tyrosine (*B26*). C'est la longueur de la séquence qui semble plutôt jouer un rôle. Si, à cet enchaînement de onze acides aminés, s'ajoute un long peptide, tel le peptide "C", peptide connecteur de la proinsuline (voir page 31), la molécule entière n'a pas d'activité. Nous constatons également que dans ce cas, le pont disulfure *A20-B19* est peu accessible par la membrane. Or, nous savons que la proinsuline, inactive biologiquement, peut avoir un effet insulinique in vitro par incubation avec des cellules adipeuses ou musculaires. Il y a alors transformation de la proinsuline en insuline sous l'influence des protéases présentes dans les cellules (page 32). Cette réaction fait appel à une rupture de la liaison entre l'alanine *B30* et l'arginine (premier terme du peptide connecteur "C"), d'où la mise en évidence du pont disulfure *A20-B19* et son accessibilité directe aux membranes cellulaires.

3°) Rôle du "transporteur"

L'insuline favorise le transport intracellulaire de substances très variées telles que glucose et acides aminés par exemple. La vitesse de ce transport doit obligatoirement être en relation avec une orientation moléculaire bien définie des molécules par rapport à la membrane. En effet, de nombreux travaux ont montré la spécificité stéréochimique du passage des sucres à travers une membrane cellulaire. Celui-ci est favorisé, pour ceux des pyranoses en forme "chaise" qui présentent un équilibre entre deux formes d'orientation dans l'espace des groupements OH et OCH_3 (plan équatorial et plan axial). Pour accélérer le transfert à l'intérieur des cellules, l'insuline doit donc être capable de rétablir l'orientation, par rapport à la membrane, de molécules toujours mobiles et désordonnées en solution aqueuse. Elle doit amener le site réactionnel le plus probable de l'ose (carbone 6 pour le glucose) en contact avec les enzymes cellulaires capables de le métaboliser. Pour jouer ce rôle de "rail", nous devons supposer que le grand axe de la molécule est sensiblement perpendiculaire au "plan" de la membrane.

La structure que nous proposons doit donc répondre à ces impératifs. De plus, elle doit tenir compte des possibilités d'association de la molécule d'insuline en dimères, trimères, tétramères et hexamères décrites page 22. La seule configuration possible nous paraît être une figure géométrique : le prisme droit à base triangulaire qui constitue le support de la structure spatiale de l'insuline (figure 16 I). Les facultés d'association sont évidentes (figure 16 II).

I



II

A B C D E

Figure 16 : Configuration géométrique proposée pour la structure spatiale de l'insuline
I - Vue d'ensemble du prisme droit à base triangulaire,
II - Vue en coupe : possibilités d'association
A - monomère
B - dimère
C - trimère
D - tétramère
E - hexamère

Une telle configuration ne peut se concevoir que si nous avons trois chaînes polypeptidiques correspondantes aux trois arêtes du prisme, chaque arête représentant l'axe support des liaisons peptidiques CO-NH.

Cette structure pourrait paraître difficile à admettre puisque la molécule d'insuline ne possède que deux chaînes. Nous devons donc supposer qu'une arête, I,

du prisme est formée par la majeure partie de la chaîne A, depuis la cystéine (*A11*) jusqu'à l'asparagine (*A21*), une deuxième, II, par la plus grande partie de la chaîne B depuis la phénylalanine en B1 jusqu'à la cystéine en B19 et la troisième arête, III, est constituée par les restes de la chaîne A du glycocolle (*A1*) à la cystéine (*A7*) et de la chaîne B (lysine (*B29*) et alanine (*B30*)).

Cette disposition est décrite sur la figure 17. Nous remarquons que l'acide aminé N terminal de la chaîne A, le glycocolle, vient se mettre en rapport avec le groupement carboxyl-terminal de la chaîne B (alanine pour l'insuline bovine) permettant une liaison type électrovalentielle.

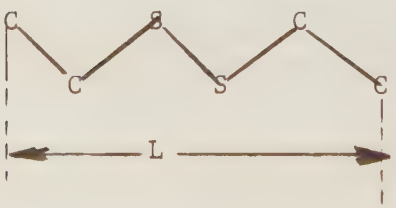
Ces trois arêtes déterminent trois faces, renfermant chacune un pont disulfure. Nous pouvons décrire trois plans :

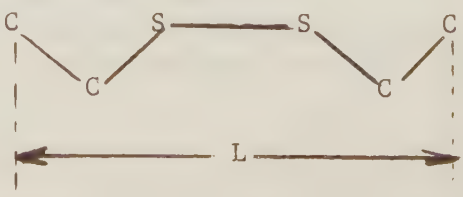
- le plan (I-II) défini par les arêtes I et II et contenant le pont disulfure *A20-B19*
- le plan (I-III) défini par les arêtes I et III et le pont *A6-A11*
- le plan (II-III) défini par les arêtes II et III et le pont *A7-B7*.

Les trois arêtes du prisme doivent être reliées les unes aux autres sans trop de déformation tout en restant sensiblement parallèles. Les liaisons sont assurées par les ponts disulfures, placés à des niveaux et dans des plans différents. Sur la figure 17 nous décrivons de haut en bas :

- un pont entre les cystéines *A7-B7* dans le plan II-III
- un pont entre les cystéines *A6-A11* dans le plan I-III
- un pont entre les cystéines *A20-B19* dans le plan I-II.

Ces liaisons disulfures peuvent être schématisées des deux façons suivantes :





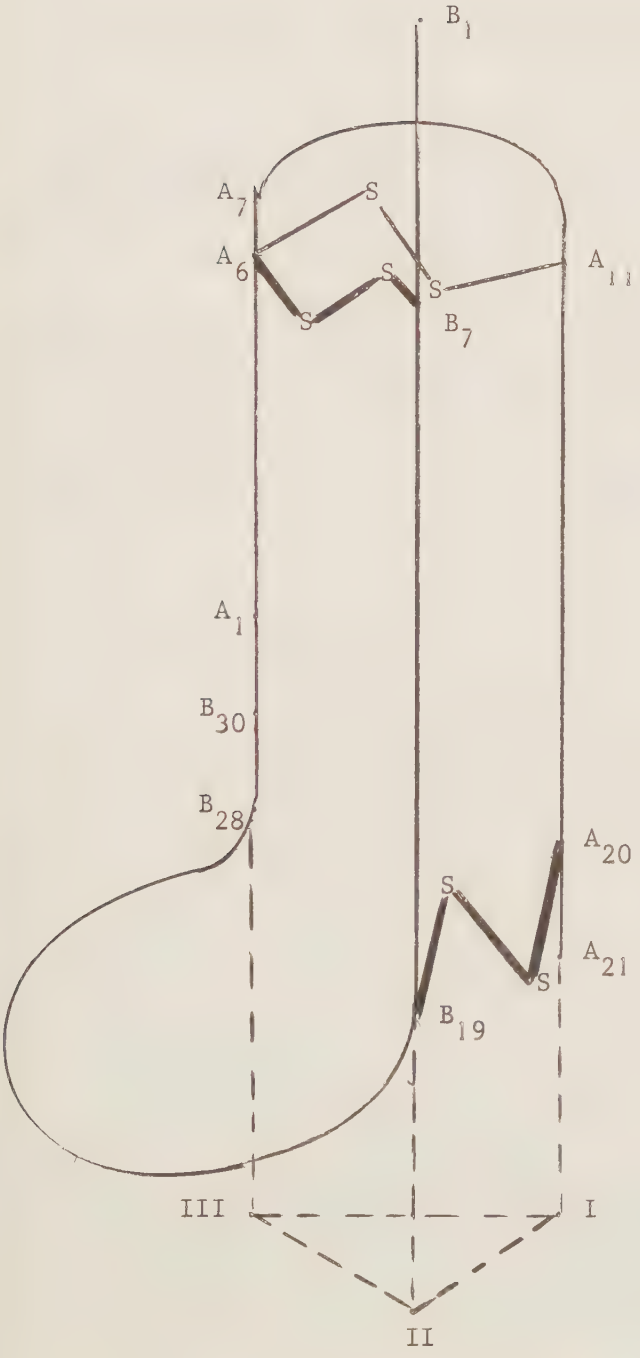


Figure 17 : Disposition relative des chaînes A et B de l'insuline suivant les trois arêtes I, II et III.

Quelle que soit la configuration, la distance L entre les carbones des deux restes de cystéine est peu différente. Cette distance a été calculée*, elle est très voisine de 7,5 A°.

Les trois ponts précédents relient les trois arêtes du prisme de telle manière qu'elles puissent rester parallèles et équidistantes. Notons que les chaînes polypeptidiques des arêtes du prisme ne comportent pas de restes de proline.

Par projection sur un plan horizontal, nous obtenons un système tripode, triangle équilatéral ayant pour côté 7,5 A°, (figure 18).

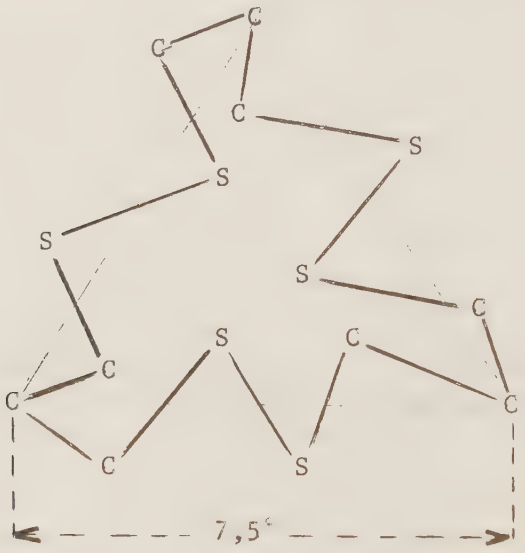


Figure 18 : Projection des liaisons disulfures sur un plan perpendiculaire à l'axe du prisme.

Une telle structure implique qu'au niveau de la séquence des acides aminés *A6 à A11* la chaîne A présente une boucle dans l'espace ainsi que la chaîne B en ce qui concerne le peptide *B20 à B27*, courbure facilitée pour ce dernier par la présence d'un reste de proline en *B28*.

* *Communication personnelle de CAZENAVE.*

Notons que les chaînes polypeptidiques peuvent présenter une certaine hélicité qui permet à la distance *B7-B19* de correspondre à la distance *A11-A20 et A6-A1-B30*.

D'après notre théorie le dièdre formé par deux plans du prisme doit former une "gouttière" laissant le passage à une molécule allongée comme le glucose en la maintenant reliée aux arêtes par des forces de liaison hydrogène.

Afin de vérifier notre hypothèse, nous avons construit un modèle moléculaire de la structure que nous proposons. Ce modèle a surtout pour but de rechercher si l'encombrement des chaînes latérales des restes d'acides aminés ne gêne pas la disposition proposée des deux chaînes A et B et si les séquences *A6-A11 et B20-B27* peuvent réellement former des boucles sans déformation de la liaison peptidique.

II - CONSTRUCTION DU MODELE

Parmi les nombreux modèles employés pour les travaux cristallographiques, nous avons choisi le type de modèle réalisé par BEEVERS (16) dit "modèle miniature". Il se compose de sphères et de tiges d'acier que l'on doit disposer sur une armature. Les dimensions interatomiques sont telles que 1 cm représente 1 A°. Les angles de valence réels sont respectés. Le modèle définitif construit représente donc une structure homothétique de la molécule originelle. Ce type de modèle présente de nombreux avantages : facilité d'utilisation, faible encombrement d'où la possibilité de construire de grosses molécules biologiques, élégance du modèle terminé.

Les atomes sont représentés par des sphères de polymères de métacrylate de méthyle de 6,9 mm de diamètre pour les atomes de carbone, azote, oxygène, soufre et de 4,9 mm de diamètre pour les atomes d'hydrogène. La couleur des sphères a été établie par convention. Pour les atomes que nous utilisons, nous observons :

des sphères noires représentant le carbone
" " rouges " l'oxygène
" " bleues " l'azote
" " jaunes " le soufre
" " blanches " l'hydrogène

Les liaisons interatomiques sont réalisées par des tiges en acier inoxydable dont la longueur, tenant compte du diamètre des sphères, reproduit la dimension de la liaison véritable.

Nous utilisons les liaisons suivantes :
C-C à 1,54 A°
C-H à 1,10 A°
C-N à 1,32 A° (liaison peptidique)
C-S à 1,56 A°
C=O à 1,43 A°
S-S à 2,08 A°

Les tiges viennent s'enfoncer dans des trous préforés à la surface des sphères. Ils sont au nombre de 1, 2, 3 ou 4 selon la valence de l'atome considéré. C'est à dire que nous avons :

pour le carbone des sphères avec :
- 4 trous à 109° représentant le carbone aliphatique
- 3 trous à 120° représentant le carbone aromatique

pour l'azote, des sphères avec :
- 4 trous à 109° pour l'azote tétravalent
- 3 trous à 120° pour l'azote trivalent : liaison peptidique par exemple.
- 2 trous à 120° pour les liaisons iminées (Arginine)

pour l'oxygène des sphères avec :
- 1 trou correspondant à une double liaison (C = O)
- 2 trous à 110° correspondant à une liaison (C-OH)

La construction du modèle se déroule en plusieurs temps. Dans un premier temps nous avons établi l'armature fixe de la molécule, c'est à dire le prisme décrit plus haut. A l'aide de fils de nylon tendus entre deux supports rigides nous avons figuré les arêtes du prisme.

Ces fils sont distants de 7,5 cm, longueur correspondante à celle calculée page 124 pour la liaison disulfure (7,5 A°).

Les acides aminés construits en configuration L sont fixés sur le fil au niveau des liaisons peptidiques qui sont coplanaires, les restes des molécules s'orientent et se disposent dans l'espace comme nous allons le voir.

Nous allons envisager et expliciter par des schémas chaque partie du modèle telle que nous l'avons construite. Sur les figures, nous avons représenté par un rectangle le radical de chaque acide aminé entrant dans la liaison peptidique. Les chaînes latérales sont schématisées par des traits verticaux dirigés vers le haut pour les groupements placés en avant du plan (c'est à dire à l'extérieur du prisme) et vers le bas pour les groupements placés en arrière du plan (à l'intérieur du prisme).

Nous décrirons tout d'abord les trois plans définis précédemment puis les deux "boucles" formées par les séquences des acides aminés *A6-A11 et B20-B28*.

1°) *Plan 1-III (figure 19)*

Il est défini par les arêtes I-III du prisme et le pont disulfure *A6-A11*. Nous commençons la construction par ce dernier en plaçant la cystéine *A11* sur l'arête I et la cystéine *A6* sur l'arête III.

A partir de la cystéine (*A6*) nous fixons sur l'arête III les premiers termes de la chaîne A de la glutamine (*A5*) au glycocolle (*A1*)

Sur l'arête I nous construisons le reste de la chaîne depuis la sérine (*A12*) jusqu'à l'asparagine (*A21*).

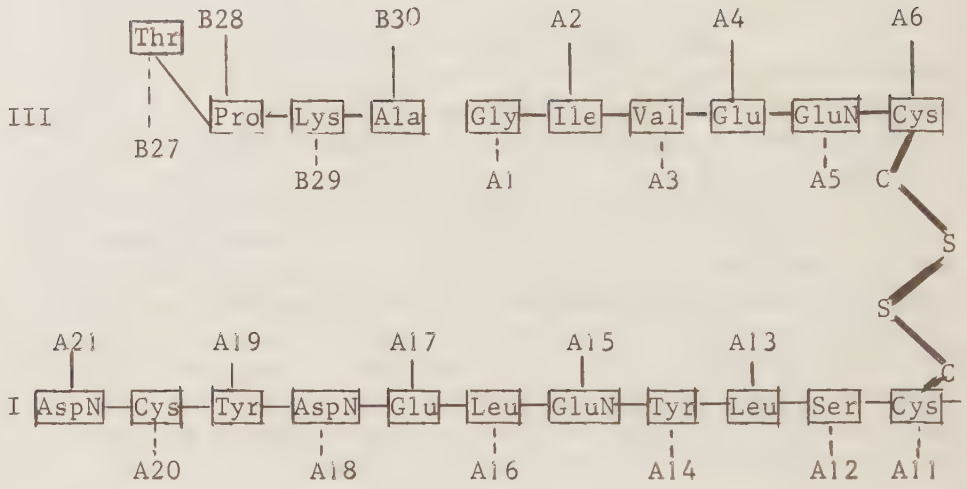


Figure 19 : Représentation schématique du plan (I-III)
Chaînes en avant du plan ———
Chaînes en arrière du plan ----

La disposition des chaînes latérales s'effectue à partir de la place des restes de cystéine *A6 et A11*.

Sur l'arête I, nous trouvons en avant du plan, c'est à dire à l'extérieur du prisme, les chaînes latérales de la leucine (*A13*), la glutamine (*A15*), l'acide glutamique (*A17*), la tyrosine (*A19*) et l'asparagine (*A21*). En arrière du plan, soit vers l'intérieur du prisme, se placent les chaînes de la sérine (*A12*), de la tyrosine (*A14*), de la leucine (*A16*), de l'asparagine (*A18*). La chaîne de la cystéine (*A20*) en arrière du plan participe à la formation du pont disulfure (*A20-B19*) dans le plan (I-II).

Sur l'arête III, la chaîne latérale de la glutamine en *A5* s'oriente vers l'intérieur du prisme ainsi que la valine en *A3*. La chaîne de l'acide glutamique (*A4*) vient à l'extérieur du plan ainsi que le reste de l'isoleucine (*A2*).

Le premier terme de la chaîne A, à groupement amino terminal, le glycocolle, vient se mettre en rapport avec l'alanine (*B30*) acide aminé carboxyterminal de la chaîne B placé également sur l'arête III. Nous fixons la lysine en *B29* reliée à la proline (*B28*). A ce niveau la chaîne s'écarte de l'arête III et amorce une "boucle" que nous décrirons ultérieurement.

1°) *Plan III-II*

Défini par les deux arêtes II et III du prisme, par le pont disulfure *A7-B7*, il est schématisé sur la figure 20. Sur l'arête III, nous trouvons le début de la chaîne A construite précédemment. Les chaînes latérales de l'isoleucine (*A2*) de l'acide glutamique (*A4*) se trouvent en dessous du plan tandis que les chaînes de la valine (*A3*) et de la glutamine (*A5*) sont en dessus du plan.

Sur l'arête II nous trouvons la majeure partie de la chaîne B. Pour la construire, nous commençons par le glycocolle en *B8* dont la position est déterminée par le reste de cystéine (*B7*) entrant dans le pont disulfure. Nous continuons la construction de la chaîne B jusqu'à la valine (*B18*) qui établit une liaison avec la cystéine (*B19*) déjà fixée dans le pont disulfure *B19-A20*. Ces deux cystéines conditionnent la position des chaînes latérales du polypeptide glycocolle (*B8*) - Valine (*B18*). Nous trouvons, au dessous du plan, les chaînes latérales de la sérine (*B9*), de la leucine (*B11*), de l'acide glutamique (*B13*), des leucines *B15 et B17* et, au dessus du plan, les chaînes de l'histidine (*B10*), de la valine (*B12*), de l'alanine (*B14*), de la tyrosine (*B16*) et de la valine (*B18*).

Sur la même arête II, nous plaçons également les six premiers termes de la chaîne B à partir de la leucine (*B6*) qui établit une liaison avec la cystéine du pont (*B7-A7*). Nous n'avons pas représenté cette partie sur la figure 20 en raison de sa moindre importance.

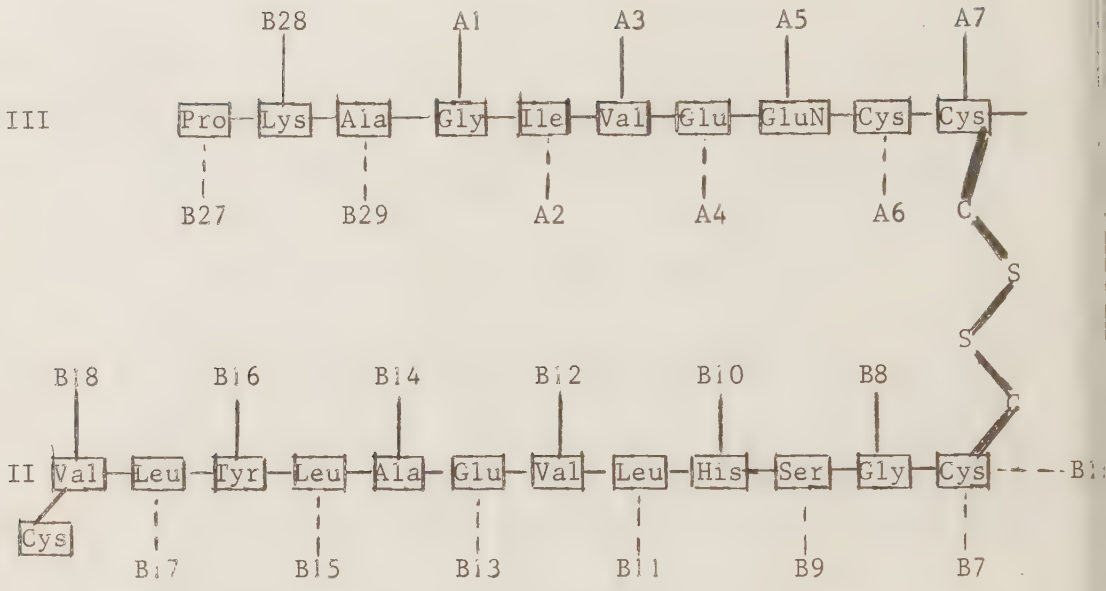


Figure 20 : Schéma du plan III-II
Chaînes en avant du plan ———
Chaînes en arrière du plan – – – –

3°) *Plan II-I*

Défini par les arêtes II et I du prisme et par le pont disulfure *A20-B19*, il est schématisé sur la figure 21.

La construction des chaînes a été réalisée précédemment. Nous décrivons, sur l'arête I, la partie de la chaîne A depuis la cystéine en *A11* jusqu'à l'asparagine terminale et sur l'arête II, la chaîne B depuis la phénylalanine (*B1*) jusqu'à la valine en *B18*.

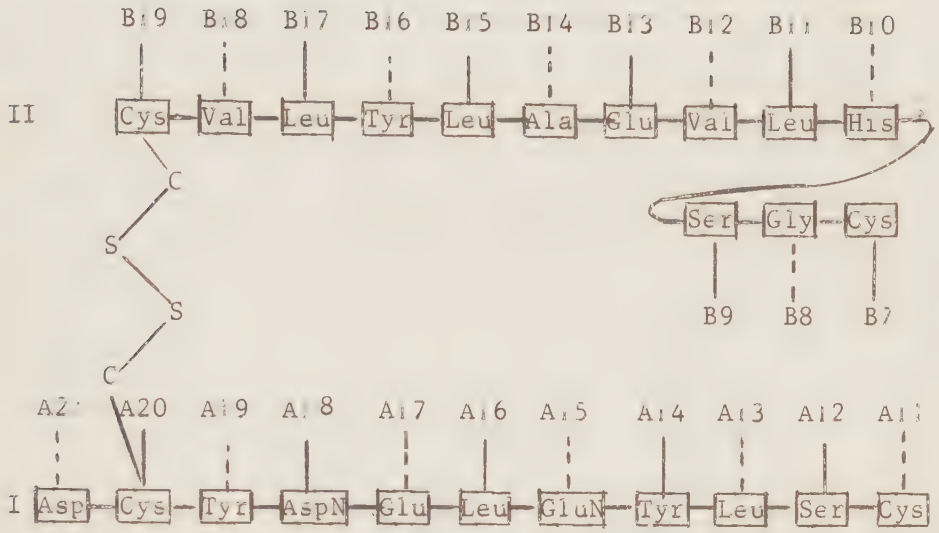


Figure 21 : Schéma du plan II-I
Chaînes latérales en avant du plan ———
Chaînes latérales en arrière du plan ---

4[c]) *"Boucle" A6-A11*

Elle est constituée d'un peptide dont les deux extrémités sont réunies par l'intermédiaire du pont disulfure interne à la chaîne A, (*A6-A11*). Représentée schématiquement sur la figure 22, cette boucle se compose de quatre acides aminés : cystéine (*A7*), alanine (*A8*), sérine (*A9*), valine (*A10*). Lors de la construction de ce peptide à l'aide des modèles de BEEVERS, nous obtenons une séquence qui possède une certaine rigidité. Pourtant, lorsque cette séquence est fixée sur le radical de la cystéine (*A6*) par l'intermédiaire de la cystéine (*A7*), nous constatons qu'une boucle se forme très facilement pour venir placer la valine (*A10*) près de la cystéine *A11* en respectant les dimensions du pont disulfure. Cette boucle n'est pas située dans le plan II-III, mais se trouve en avant, à l'extérieur du prisme.

[c] *Pour des raisons typographiques les acides aminés B9, B8, B7 ont dû être placés au dessous de l'arête au lieu d'être alignés avec elle.*

Les chaînes latérales des quatre acides aminés se placent vers l'extérieur de la "boucle" où aucun problème d'encombrement stérique ne se pose. Or cette séquence est celle qui subit le plus de variations suivant les espèces animales considérées. D'après notre structure, nous voyons que l'on peut remplacer n'importe quel acide aminé la constituant sans modifier la molécule entière.

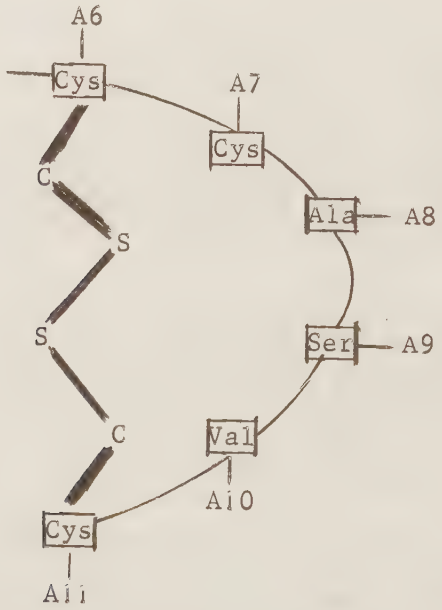


Figure 22 : Schéma de la séquence A6-A11

5°) *"Boucle" A20-B19*

Elle comprend neuf acides aminés situés sur la partie terminale de la chaîne B depuis la cystéine en *B19* jusqu'à la proline en *B28*. La configuration de ce peptide est déterminée par notre hypothèse elle même puisque nous plaçons le pont disulfure *A20-B19* en position terminale sur notre modèle. Pour cela, à partir de la cystéine *B19* fixée sur l'arête II, nous construisons le polypeptide

terminal de la chaîne B. Nous constatons que cette séquence peut suivre grossièrement un arc de cercle de 10 cm de rayon environ. Le plan de ce cercle serait sensiblement perpendiculaire à l'axe du prisme (I-II-III).

La boucle est déformée dans sa partie terminale en raison de la présence d'une molécule de proline (*B28*) les acides aminés Lys (*B29*), Ala (*B30*) viennent se fixer sur l'arête III en regard du glycocolle (*A1*) de telle façon que le groupement carboxylique de l'alanine soit en rapport avec le groupement aminé du glycocolle. La distance les séparant permet l'établissement d'une liaison électrovalentielle qui contribue à assurer la stabilité de l'ensemble.

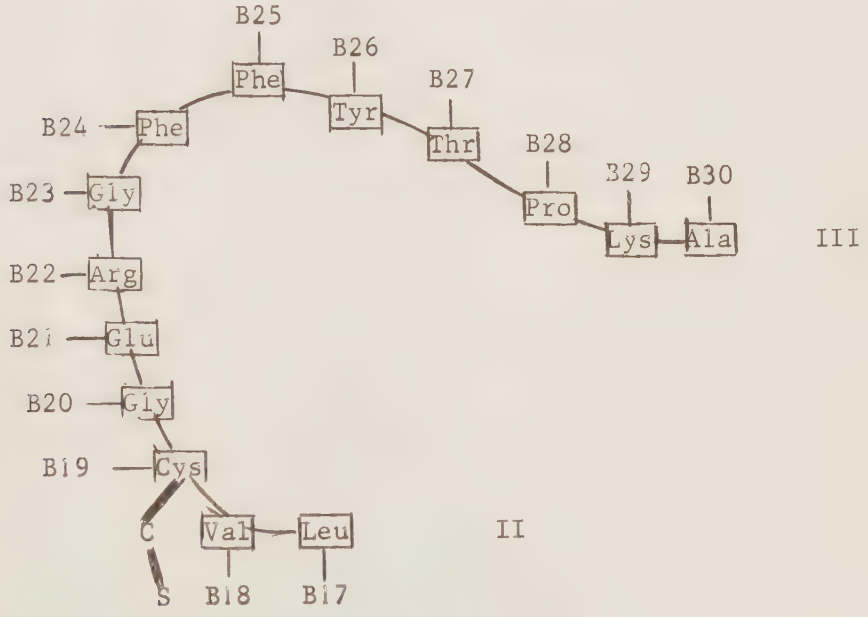


Figure 23 : Schéma de la séquence B19-A20

Les diverses parties que nous venons de décrire constituent la molécule d'insuline entière qui est représentée sur la figure 24.

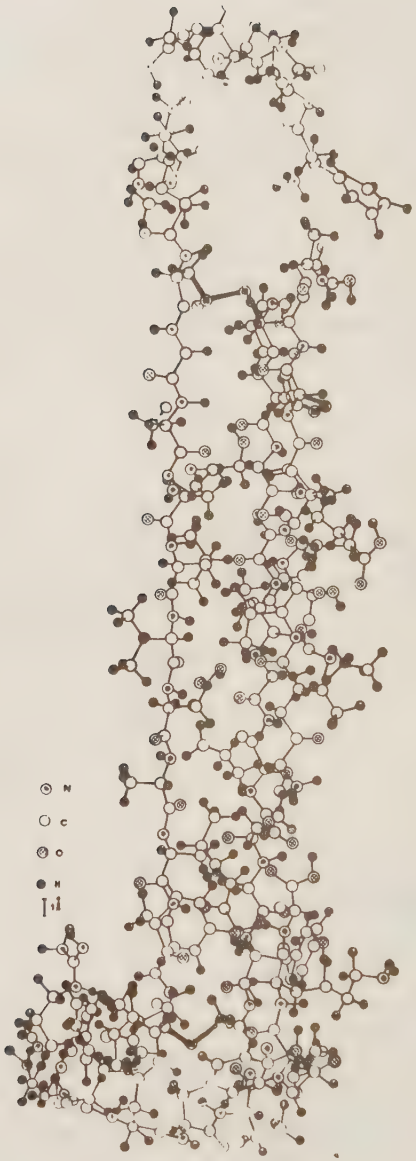


Figure 24 : Modèle de structure de l'insuline bovine. Forme active (1 cm = 1 A°).

III - DISCUSSION

La structure que nous venons d'établir est celle du monomère d'insuline bovine de poids moléculaire 5733. D'après notre hypothèse même, les possibilités d'association de la molécule sont respectées par la configuration prismatique (page 113). La présence de Zn^{++} dans le dimère ou le tétramère ne modifie pas la structure. Des liaisons covalentielles interviennent entre l'ion métallique et les molécules d'histidine (*B5 et B10*) des chaînes B de deux monomères. D'après notre modèle, la présence de l'histidine (*B10*) à l'extérieur du plan (II-I) facilite la liaison. Les chaînes B des deux molécules d'insuline se disposent parallèlement, la stabilité du dimère étant favorisée par des forces de Van der WAALS. L'ensemble admet un axe de symétrie passant par le zinc et parallèle aux axes des molécules. La distance séparant les centres des deux monomères, en tenant compte d'une longueur de 2 A° pour la liaison Zn - N (histidine), est d'environ 10 A°, valeur compatible avec les travaux de LOW (1;9) qui a établi une longueur de 10,5 A° entre les centres des deux molécules associées en dimère.

Sur notre modèle, nous avons représenté les chaînes polypeptidiques de l'insuline sous forme de structure β, correspondant à l'étalement maximum de la protéine. Chaque acide aminé a, sur l'arête, une longueur de 3,6 A°. La longueur totale mesurée est la longueur maximum que puisse prendre la molécule. C'est ainsi que nous avons :

- sur l'arête I, une longueur de 40 A° depuis la cystéine *A11* jusqu'à l'asparagine *A21*.
- sur l'arête II, une longueur de 22 A° de la phénylalanine *B1* à la cystéine *B7*, puis une longueur de 43 A° de cette même cystéine à celle placée en *B19*, soit un total de 65 A° pour cette même arête.
- sur l'arête III, une longueur de 22 A° entre le glycocolle *A1* et la cystéine *A7*, une longueur de 10 A° entre le reste de la proline *B28* et l'alanine terminale *B30* qui se place à 2 A° environ de la chaîne A. La longueur totale est donc de 35 A° pour cette arête.

Ces dimensions correspondent à un étirement de la molécule et il est peu probable qu'elle se présente ainsi en réalité. Nous avons vu qu'un certain pourcentage d'hélicité avait été démontré par plusieurs auteurs. Les résultats sont très variables mais nous pouvons estimer qu'environ un tiers de la molécule possède la structure d'hélice α. Sur notre modèle, il est facile d'envisager l'apparition de cette hélice pour les fragments de chaîne B de *B1 à B6* (premiers termes de la chaîne) et de *B8 à B18* ou pour la chaîne A dans la partie comprise entre les deux ponts disulfures soit de *A12 à A19*. Dans ce cas, la longueur correspondante à un acide aminé sur l'arête est de 1,5 A°. La dimension totale de la molécule se trouverait donc diminuée sans changer de configuration ; elle ne dépasserait pas 30 A°.
La présence d'hélice α n'est cependant pas possible au niveau des "boucles" *A6 - A11 et B19 - B30*. Ces résultats coïncident avec les travaux de MENENDEZ (128) qui attribue une structure β à l'heptapeptide (*B23 - B29*), provenant de l'hydrolyse trypsique de l'insuline.

Si nous reprenons les résultats des travaux cristallographiques effectués par CROWFOOT et son école, nous constatons que la maille élémentaire du cristal rhomboedrique d'insuline-Zinc ou orthorhombique de sulfate d'insuline admet une hauteur de 31 A° à l'état sec. Cette valeur s'accorde bien avec les dimensions de notre modèle.

L'étude de la proinsuline apporte des arguments supplémentaires. Nous avons déjà vu que cette molécule inactive biologiquement présente de grandes similitudes avec l'insuline : mêmes possibilités d'association en dimères, trimères et surtout hexamères, unités des cristaux ; mêmes pourcentages d'hélicité (59). Il faut donc penser que l'insuline et la proinsuline possèdent pratiquement la même structure. D'après notre modèle, cela se conçoit très facilement. En effet, la seule différence entre les deux molécules porte sur la partie terminale de la chaîne B, au niveau de la boucle *A20 - B19*. La présence dans la molécule de la proinsuline, d'un long peptide réunissant l'alanine (*B30*) au glycocolle *A1* de l'insuline réalise un encombrement à ce niveau qui, en masquant le pont disulfure *A20 - B19* interdit

la formation de la boucle. Tout le reste de la molécule se dispose comme la molécule d'insuline, d'où la même proportion d'hélice α.

Notre hypothèse permet également de comprendre les problèmes posés par la mesure de l'insulinémie. L'activité antigénique dosée par les méthodes radioimmunologiques est dévolue essentiellement à une partie de la chaîne A située en position terminale sur notre modèle (séquence A *A6 - A10*). Cette partie identique pour l'insuline et la proinsuline, est diamètralement opposée à l'extrémité responsable de l'activité biologique. L'intégrité de la séquence antigénique n'entraine pas forcément l'intégrité de structure du reste de la molécule et en particulier la bonne position du pont disulfure *A19 - B20* vis à vis des récepteurs membranaires.

Ces remarques expliquent pourquoi les méthodes radioimmunologiques dosent la proinsuline aussi bien que l'insuline et pourquoi des résultats normaux et même élevés sont obtenus chez certains sujets diabétiques à diabète non consomptif. Dans ce dernier cas, deux raisons interviennent :

- l'insuline présente en quantité normale dans le sérum est incapable de prendre, pour une raison inconnue, la forme "active" que nous proposons
- les récepteurs membranaires sont bloqués par des antagonistes qui agiraient selon une réaction de compétition avec l'insuline. C'est à ce niveau que se situerait la synalbumine de VALLANCE-OWEN. Si l'on admet que ce produit est composé d'albumine et d'une chaîne B isolée de l'insuline, on peut concevoir qu'une analogie de structure avec l'insuline active, lui permette de se fixer sur les récepteurs de la membrane sans pouvoir réaliser l'action biologique de l'insuline entière.

Si la structure que nous présentons s'accorde bien avec les propriétés connues de l'hormone pancréatique, il faut cependant préciser comment elle permet de concevoir l'action de l'insuline au niveau du passage à travers la membrane des diverses molécules.

En considérant l'ensemble du modèle, nous constatons qu'il se présente comme une "gouttière" allongée suivant le grand axe du prisme. L'encombrement des chaînes latérales des acides aminés se trouve réparti sur la surface extérieure du prisme. A l'intérieur, dans le dièdre formé par les plans I-III et II-III se trouve un "canal" ayant pour axe celui du prisme. Il est évident qu'il doit jouer un rôle dans l'orientation et le transport des molécules. En effet, nous avons déjà vu (page 114) que la fixation sur les chaînes latérales de substituants volumineux entraînait une perte d'activité. On peut penser qu'il y a, dans ce cas, une obstruction du canal.

Pour vérifier ce point, nous avons réalisé la construction d'une molécule de glucose à partir des mêmes éléments de BEEVERS. Nous avons choisi le glucose car il représente l'une des plus importantes molécules sensibles à l'insuline. Nous verrons que les mêmes conclusions s'appliquent également aux acides aminés et aux acides gras.

Nous avons construit un α D glucopyranose en forme "chaise", forme la plus stable. Par projection sur un plan horizontal, cette molécule s'inscrit dans un ellipsoïde dont le grand axe mesure 5 A° environ et le petit 3 A°. Cette dernière dimension correspond à celle calculée théoriquement[c] pour le cycle pyrannique (voisine de 2,8 A°). En confrontant cette molécule et notre modèle de l'insuline, nous constatons que le glucose se place dans le "canal" constitué par l'insuline. Il est obligé de se disposer dans un sens tel que son grand axe soit parallèle à l'axe du prisme. L'intervalle disponible entre les chaînes de l'insuline étant, d'après notre construction, d'environ 5 A°, la molécule de glucose passe aisément le long du canal, lorsqu'elle est bien orientée. La distance séparant les groupements oxydriles de l'ose des groupements aminés et hydroxyles des chaînes A et B est compatible avec la création de liaisons hydrogène. Expérimentalement, pour chaque position du glucose dans le canal constitué par l'insuline nous pouvons montrer l'existence de liaisons hydrogène assurant la stabilité de l'ensemble insuline-glucose.
Le "rail" réalisant l'orientation de la molécule de glucose

[c] *Communication personnelle de CAZENAVE.*

est donc constitué par des liaisons hydrogène.

L'intervention de ces liaisons, ainsi que la pénétration du glucose dans la molécule d'insuline nécessite cependant une condition essentielle : le glucose doit se débarrasser de sa "robe" d'eau. En effet, très hydrophile, il est toujours entouré d'un certain nombre de molécules d'eau qui modifient considérablement ses dimensions. Or, dans le canal de l'insuline, la place est limitée et de plus la formation de liaisons hydrogène rend impossible la présence d'eau intermédiaire. Le mécanisme permettant de débarrasser le glucose de ses molécules d'eau pourrait être comparable à celui intervenant lors des réactions enzymatiques.

Le glucose anhydre est donc amené au contact de la membrane dans un sens bien déterminé, sans doute le plus favorable à son introduction. Son site réactionnel est pris en charge par un transporteur pouvant être de nature lipidique puisqu'il n'y a plus d'eau présente. La vitesse du passage se trouve donc augmentée.

Le système insulinique, largement ouvert "en éventail" admet une probabilité de pénétration élevée puisque les molécules peuvent passer par n'importe laquelle des trois faces.

La même démonstration pourrait s'appliquer aux autres oses car tous ont pratiquement le même encombrement. La place des groupements oxydriles (α ou β) conditionne cependant la formation d'un plus ou moins grand nombre de liaisons hydrogène. Par suite le cheminement de l'ose tout au long de l'insuline sera plus ou moins rapide et facile. La sélection des divers sucres s'effectue à ce niveau. Cela confirme les travaux de PARK (141) sur l'importance de la configuration spatiale des oses, en particulier de la place des substituants pour leur sensibilité à l'insuline.

Nous pouvons également envisager un même schéma pour l'orientation et la pénétration des acides aminés et acides gras. Pour les premiers, constitués de chaînes polypeptidiques, le passage est facilité du fait

de la nature peptidique de l'insuline. Dans le cas des acides gras, la présence de chaînes aliphatiques permet l'établissement de forces de Van der WAALS avec les chaînes latérales polyéthéniques de certains acides aminés de l'insuline (isoleucine par exemple). Le même mécanisme que pour le glucose peut être décrit, moins rapide peut-être.

Lors de leur pénétration, les acides gras ne doivent pas se présenter sous forme de dérivés acylés, en raison de l'encombrement de ce radical acyl, mais sous forme d'acides gras libres.

La structure de l'insuline que nous venons de présenter permet donc d'expliquer facilement l'action de l'hormone vis à vis du passage transmembranaire de plusieurs substances. Cette action est essentiellement sous la dépendance de la configuration spatiale des molécules transportées et cela explique pourquoi même des substances non métabolisables telles que l'acide α aminoisobutyrique, le L arabinose, le D xylose pénètrent dans la cellule, alors que des sucres métabolisables tels que le d fructose, le d mannose, ne sont pas sensibles à l'action insulinique, la place de l'oxydrile en *C2* joue en particulier un grand rôle, certainement vis à vis de la formation de liaisons hydrogène.

Le système qui s'établit : insuline-molécule anhydre, est compatible avec la nature lipidique de la membrane et avec le système transporteur qui est certainement de nature hydrophobe. De nombreuses recherches sont actuellement en cours pour connaître la nature de ce transporteur et en particulier celui du glucose. Dans le cadre de notre laboratoire, des travaux s'effectuent actuellement pour apporter plus de précisions à ce sujet. Il semble que la présence d'un acide phosphatidique ne soit pas à écarter, mais l'état des résultats ne permet encore aucune conclusion.

CONCLUSIONS GENERALES

Notre travail a pour but de présenter une structure tertiaire de la molécule d'insuline permettant d'expliquer l'action de cette hormone au niveau de la perméabilité cellulaire. Il est divisé en plusieurs parties :

La première partie est une mise au point des données actuelles sur le diabète et l'hormone pancréatique. Nous avons rappelé brièvement les diverses étapes parcourues depuis la découverte en 1921 de l'insuline, tout en insistant sur le fait que, malgré les progrés réalisés dans la connaissance du diabète, la place exacte de l'insuline dans le déterminisme de cette maladie n'est pas encore bien établie. Nous avons décrit, plus en détail, dans un premier chapitre, la molécule d'insuline elle-même, sa structure et sa synthèse et dans un second chapitre ses propriétés biologiques et immunologiques. Nous avons pu constater alors que cette molécule, bien connue lorsqu'elle est isolée du pancréas ou synthétisée, pose encore beaucoup de problèmes quant à son devenir et son action dans l'organisme. La mesure de l'insulinémie revêt toute son importance et dans un dernier chapitre nous avons rapidement passé en revue les principales méthodes de dosage qui ont pu être proposées tant "biologiques" qu'"immunologiques.

La deuxième partie de notre exposé est consacrée à nos recherches expérimentales concernant la mise au point d'une méthode simple de dosage de l'insulinémie.

La technique radioimmunologique que nous avons envisagée dans un premier temps est actuellement la seule méthode entrant dans sa phase d'application, voire de semi-routine. Elle conduit à des résultats constants, reproductibles et parait relativement spécifique. Cependant nous avons constaté à la lumière de certains cas pathologiques, que cette méthode était incapable de nous donner une image valable de l'état de l'insuline dans le sang et qu'elle dosait seulement une activité insulinique.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à mettre au point une technique biologique de dosage de l'insulinémie plus simple et plus rapide que celles existantes. A l'aide d'un appareillage automatique, nous avons mesuré la consommation en glucose de cellules vivantes isolées, préparées à partir de tissu musculaire, rénal, cardiaque et adipeux de rat. En présence d'insuline cette consommation augmente de façon très apparente pour les cellules adipeuses, beaucoup moins pour les cellules cardiaques et musculaires. Les résultats ne nous permettent pas d'établir un protocole utilisable en pratique, mais ils mettent l'accent sur le rôle de l'insuline au niveau cellulaire, vis à vis des tissus sensibles à son action.

Après avoir, dans une troisième partie, fait le point sur la structure des membranes cellulaires et rappelé les diverses hypothèses concernant le mécanisme d'action de l'insuline, nous avons précisé les relations pouvant exister entre la structure moléculaire de l'hormone pancréatique et son action biologique. Nous avons pu déterminer l'importance de la structure tridimensionnelle de l'insuline.

Les diverses hypothèses émises à ce sujet ne permettent pas d'expliquer l'action de la molécule hormonale et nous avons montré que le modèle de structuree établi par LINDLEY ne peut s'appliquer à la forme active de l'insuline.

Dans la dernière partie de notre travail, nous présentons la construction d'un modèle moléculaire de l'insuline réalisé à l'aide d'éléments de BEEVERS. La molécule obtenue respecte les dimensions de l'insuline réelle à l'échelle de 1 cm pour 1 A°. Ce modèle est caractérisé par la disposition des deux chaînes polypeptidiques A et B selon les trois arêtes d'un prisme droit à base triangulaire. Les côtés de ce triangle sont égaux et représentent la dimension d'un pont disulfure. La première arête du prisme est formée par la plus grande partie de la chaîne A, la seconde par la plus grande partie de la chaîne B et la troisième par les restes des chaînes A et B. A chaque extrêmité des arêtes se trouve une cystéine. Pour réaliser cette configuration, deux "boucles" sont nécessaires, l'une correspondant à la séquence des acides aminés de la chaîne A en *A6 et A11*, l'autre correspondant aux acides aminée *B19 à B28*.

Cette structure laisse un espace libre le long de l'axe du prisme. Dans ce "canal", une molécule de D glucopyranose peut se déplacer facilement en restant toujours reliée aux chaînes A et B de l'insuline par des liaisons hydrogène.

Nous avons explicité un mécanisme d'action de l'insuline au niveau du passage transmembranaire de certaines substances : oses, acides aminés, acides gras. Deux points sont essentiels : l'orientation des molécules et la formation d'un complexe insuline-molécule anhydre. Ce dernier caractère est compatible avec la nature lipidique de la membrane cellulaire.

BIBLIOGRAPHIE

Devant le nombre très élevé des articles traitant de l'insuline, nous avons réduit notre bibliographie aux seuls articles qui nous semblaient indispensables à notre travail.

REVUES GENERALES

- BITTAR E.E. - Membranes and ion transport. 2 vol., Wiley Interscience édit., London, 1970.

- CAHN Th. - La régulation des processus métaboliques dans l'organisme. 1 vol., 674 p., Presses Universitaires de France édit., Paris, 1956.

- FLORKIN M., MASON H.S. - Comparative biochemistry. A comprehensive treatise. Vol VI. Cells and organisms. 1 vol., 560 p. Academic Press New York, 1964.
  Vol VII. Supplementary volume. 1 vol., 475 p., Academic Press New York, 1964.

- KOPPLE D.K. - Peptides et acides aminés. 1 vol., 186 p., Ediscience, Paris, 1968.

- LEIBEL B.S., WRENSHALL G.A. - On the nature and treatment of diabetes. Excepta Medica. International congress, séries n° 84. 1 vol., 805 p., Amsterdam, 1965.

- NEURATH H. - The proteins. Composition, structure. Academic Press, New York, second edition 1963. Vol. I, 664 p., Vol. II, 580 p., Vol III, 572 p.

- PFEIFFER E.F. - Handbuch des diabetes Mellitus. 1 vol., Lehmamn J.F. édit., München, 1969.

- SCHERAGA A.H. - Protein structure. 1 vol., Academic Press New York, 1961.

- TRIA E., SCANU A.M. - Structural and functionnal aspects of lipoproteins in living systems. 1 vol., 651 p. Academic Press, London, 1969.

- VILLANUEVA J.R., PONZ F. - Membranes. Structures and function. 1 vol., 150 p. Academic Press, New York, 1970.

- WOLSTENHOLME G.E.W., O'CONNOR C.M. - Internal secretion of pancreas. Ciba foundation Colloquia on Endocrinology. Churchill J.A., édit., London, 1956, 9, 292 p.

REFERENCES

1 - ABEL J.J. - Cristalline insuline. J. Pharmacol., 1925, 25, 423-425.

2 - ADAMS M.G., COLLER B.A., CROWFOOT-HODGKIN D., DODSON G.G., - X rays crystallographic studies on insulin zinc crystals. Amer. J. Med., 1966, 40, 667-671.

3 - ANDRES R., BALTAZAN M.A., CADER G., ZIERLER K.L. - Effect of insulin on carbohydrate metabolism and on potassium in the forearm of man. J. clin. Invest., 1962, 41, 108-112.

4 - ANTONIADES H.N., BEIGELMAN P.M., PENNEL R.B., THORN G.M., ONCLEY J.L. - Insulin-like activity of human plasma constituents. III - Elution of insulin-like activity from cationic exchange resin. Metabolism, 1958, 7, 266-275.

5 - ANTONIADES H.N., GUNDERSEN K. - Studies on the state of insulin in blood : dissociation of purified human blood insulin complexes with incubation with adipose tissue extracts in vitro. Endocrinology, 1961, 69, 36-42.

6 - ARQUILLA E.R. - Immunological studies of insulin. In WOLSTENHOLME loc. cit.

7 - ARQUILLA E.R., STAVITSKY A.B. - The production and identification of antibodies to insulin and their use in assaying insulin. J. clin. Invest., 1956, 35, 458-464.

8 - AUBERTIN E. - L'insuline. 1 vol. Doin ed., Paris 1926, 490 p.

9 - AUBERTIN M.J. - La proinsuline. Bordeaux Médical, 1971, 2, 297-310.

10 - AUBERTIN E., CASTAGNOU R. - Etude comparative de l'action hypoglycémiante de l'insuline chez les mêmes chiens après et avant dépancréatisation. C.R. Soc. Biol., (Paris) 1935, 118, 697-702.

11 - AZERAD E. - Biochimie de l'insuline (structure, synthèse, antigénicité, formes circulantes, antagonistes inhibiteurs). Path. Biol., 1965, 13, 1103-1117.

12 - BALL G., MARTIN D.B., COOPER O. - Studies on the metabolism of adipose tissue. The effect of insulin on glucose utilization as mesured by manometric dermination of carbon dioxide output. J. biol. Chem., 1959, 234, 774.

13 - BALL E.G., MERILL A. - A manometric assay of insulin and some results of the application of the method to serum and islets containing tissues. Endocrinology, 1961, 69, 596-599.

14 - BANTING F.G., BEST V.H. - The internal secretion of the pancreas. J. Lab. clin. Med., 1922, 7, 251. In BEST (23)

15 - BANTING F.G., FRANK W.R., GAIRNS S. - Anti-insulin activity of serum of insulin-treated patient. Amer. J. Psychiat. 1938, 95, 562.

16 - BEEVERS C.A. - On the representation of crystal structure results. J. appl. Cryst., 1970, 3, 45-49.

17 - BEIGELMAN P.M., GOETZ F.C., ANTONIADES H.N., THORN G.W. - Bioassay for insulin activity utilizing glucose uptake by adipose tissue. Metabolism, 1960, 9, 580-584.

18 - BERSON S.A., YALOW R.S. - Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin binding antibody. J. clin. Invest., 1959, 38, 1996-2015.

19 - BERSON S.A., YALOW R.S. - Species specificity of human serum anti-beef, anti-pork insulin. J. clin. Invest., 1959, 38, 2017-2019.

20 - BERSON S.A., YALOW R.S. - Plasma insulin in health and disease. Amer. J. Med., 1961, 31, 874-881.

21 - BERSON S.A., YALOW R.S., BAUMAN A., ROTSCHILD M.A. - Insulin ^{131}I metabolism in human subjects : demonstration of insulin binding on globulin in the circulation of insulin treated subjects. J. clin. Invest., 1956, 35, 170-175.

22 - BESSMAN S.P. - A molecular basis for the mechanism of insulin action. Am. J. Med., 1966, 36, 740-749.

23 - BEST H.C. - Forty years of interest in insulin. Brit. med. Bull., 1960, 16, 179-182.

24 - BEST H.C., DALE H.H., HOET J.J., MARKS H.P. Proc. roy. Soc.Can., 1926, 87, 100. In BEST (23).

25 - BEST H.C., SCOTT D.A. - Preparation of insulin. J. biol. Chem. 1923, 57, 709-712.

26 - BIERMAN E.L., SCHWARTZ J., DOLE V.P. - Action of insulin on release of fatty acids from tissue stores. Amer. J. Physiol., 1957, 191, 357-362.

27 - BLOCH K., KRAMER N., FOLLEY S.J.D., GREENBAUM A.L. - Insulin and metabolism of fatty acids. Brit. med. Bull., 1960, 16, 3, 30-33.

28 - BOEUF G. - Contribution à l'étude du dosage radio-immunologique de l'insuline plasmatique. Thèse Med. Marseille, 1966, 117 p.

29 - BORNSTEIN J. - A technique for the assay of small quantities of insulin using alloxan diabetic, hypophysectomised adrenalectomised rats. Aust. J. exp. Biol. med. Sci., 1950, 28, 87-93.

30 - BRUGSCH H., HOSTER H. Arch. exper. Path. Pharmak., 1930, 148, 295-309. In LYNGSØE (123).

31 - CARLIN H., HECHTER O. - Preliminary communication. The disulfide-sulfhydryl interchange as a mecanism of insulin action. J. biol. Chem., 1962, 237, 1371-1374.

32 - CARPENTER H.F., BAUM W.E. - Rates of production of alanine and heptapeptide and of loss of biological activity during digestion of insulin with trypsin. J. Biol. Chem., 1962, 237, 409.

33 - CARPENTER H.F., BAUM W.E. - The chemical structure of insulin. In WOLSTENHOLME, loc. cit., 110-113.

34 - CHABANIER H., LEBERT M., LOBO-ONELL C. - De l'action de l'extrait alcoolique de pancréas (insuline) sur la glycémie critique. Bull. Soc. Chim. biol., (Paris) 1923, 5, 389-397.

35 - CHAMBERLAIN M.J., STIMMLER L. - The renal handling of insulin. J. Clin. Invest., 1967, 46, 911-915.

36 - CHANCE R.E., ELLIS R.M. - Proinsulin. Single chain precursor of insulin. Arch. intern. Med., 1969, 123-127.

37 - CHANCE E., ELLIS R.M., BROMER W.W. - Porcine proinsulin. Characterisation and amino-acid sequence. Science, 1968, 161, 165-168.

38 - CHIBNALL A.C. - The contribution of the analytical chemist to the problem of protein structure. J. Inter. Soc. Leather Trades Chimists., 1946, 30, In PFEIFFER Loc. Cit.

39 - CLARK J.L., STEINER D.F. - Insulin biosynthesis in the rats : demonstration of two proinsulin. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 1969, 62, 278-280.

40 - COLLIP J.B., BANTING F.G., BEST C.H., MAC-LEOD J.J. - The preparation of insulin. J. biol. Chem., 1923, 55, 39-44.

41 - COORE H.G., RANDLE P.J. - Regulation of insulin secretion studied with pieces of rabbit pancreas incubated in vitro. Biochem. J., 1964, 93, 66-69.

42 - CROFFORD O.B. - The uptake and inactivation of native insulin by isolated fat cells. J. biol. Chem., 1968, 243, 2, 362-369.

43 - CROFFORD O.B., RENOLD E.A. - Glucose uptake by incubation rat epididymal adipose tissue, rate limiting and site of insulin action. J. biol. Chem., 1965, 240, 14-21.

44 - CROWFOOT-HODGKIN D., OUGHTON B. - A speculation of insulin. In WOLSTENHOLME, loc. cit., 133-146.

45 - CROWFOOT D., RILEY D. - X rays measurements on wet insulin crystal. Nature, 1939, 144, 1011-1016.

46 - DAVSON H.A., DANIELLI J.F. - Structure of erythrocyte membrane. A proposed model. J. cell. comp. Physiol., 1935, 5, 495-508.

47 - DAVSON H., DANIELLI J.F. - The permeability of natural membranes. Cambridge University Press. London, 1952, 1 vol, 135p. In BITTAR Loc. Cit.

48 - DIXON G.H., WARDLAW A.C. - Regeneration of I.L.A. from the separated und inactive A and B chains. Nature, 1960, 188, 721-725.

49 - DOBSON M. - Experiments and observation on the urine in diabetes medical observations an inquiries. 1776, 5, 298. In RENOLD (151).

50 - DODSON E., HARDING M., CROWFOOT-HODGKIN D. - The crystal structure of insulin : evidence for a 2-fold axis in Rhombohedral zinc insulin. J. Mol. Biol., 1966, 16, 227-241.

51 - DU. Y.C., JIANG R.Q., TSOU C.L. - Conditions for successful resynthesis of insulin from its glycyl and phenylalanyl chains. Sc. Sinica., 1965, 14, 229-235.

52 - DULBECCO R., VOGT M. - Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelites virus. J. exp. Med., 1954, 99, 167-182.

53 - DUPRE J., CURTIS J.D., UNGER R.J., WADDELL R.W., BECK J.C. - Effects of secretin, pancreozymine or gastrin on the response of the endocrine pancreas to administration of glucose in man. J. clin. Invest. 1969, 48, 745-750.

54 - EBOUE-BONIS D., CHAMBAUT A.M., VOLFIN P., CLAUSER H. - Action sélective de la N.E.M. sur la stimulation par l'insuline du diaphragme en survie. Bull. Soc. Chim. biol., 1967, 49, 4, 515-519.

55 - EVANS R.L., SAROFF H.A. - A physiologically active guanitinated derivative of insulin. J. biol. Chem., 1957, 228, 296-300.

56 - FAJANS S.S., CONN J.W. - Prediabetes, subclinical diabetes and latent clinical diabetes interpretation diagnosis and treatment. In LEIBEL, loc. cit., 641-656.

57 - FISHER R.B. - Action of insulin on carbohydrate metabolism. Brit. med. Bull., 1960, 16, n°3, 224-227.

58 - FRAENKEL C.J., FRAENKEL-CONTRAT H. - The essential groups of insulin. Biochim. biophys. Acta., 1950, 5, 89-92.

59 FRANK B.H., VEROS A.J. - Physical studies on proinsulin. Molecular weight, association behavior and spectral studies. Fed. Proc., 1968, 27, 392-401.

60 - FREDERICQ E. - The association of insulin molecular units in aqueous solution. Arch. Biochem., 1956, 65, 218-224.

61 - FROESCH E.R., BÜRGI H., RAMSEIER E.B., PALLY P., LABHART J. - Antibody-suppressible and non suppressible insulin like-activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. J. clin. Invest. 1963, 42, 1816-1821.

62 - GAJDOS A. - Biochimie de l'insuline. Médecine et Biochimie, deuxième série, 1 vol, 420 p, MASSON Cie ed. Paris, 1971, 95-145.

63 - GELLHORN E., FELDMAN J., ALLEN A. - Assay of insulin on hypophysectomised, adrenodemedullated rats. Endocrinology., 1941, 29, 137-145.

64 - GEMMIL G.L. - The effect of glucose and insulin on the metabolism of the isolated rat diaphragm. Bull. Johns Hopk. Hosp., 1941, 68, 50-53.

65 - GORDEN Ph. M.D., ROTH J.M.D. - Circulating insulins. Arch. intern. Med., 1969, 123, 237-243.

66 - GRANT P.T., REID K.B.M. - Biosynthesis of an insulin precursor by cod islet tissue and the occurence of intermediates in the conversion to insulin. Biochem. J., 1968, 109, 32-36.

67 - GREEN M., MILLER L.L. - Protein catabolism and protein synthesis in perfused livers of normal and alloxan diabetic rats. J. biol. Chem., 1960, 235, 3002-3005.

68 - GREMY F., SALMON D. - Bases statistiques pour la recherche médicale et biologique. 1 vol., 412 p., DUNOD Paris, 1969, 156-165.

69 - GRODSKY G.M. - Dosage par formation de fibrilles et mesure néphélométrique. Biochem. J., 1958, 68, 142-146.

70 - GRODSKY G.M., BENNETT L.L., SMYTH D.F., SCHMID F.G. - Effect of pulse administration of glucose on insulin secretion in vivo. Metabolism, 1967, 16, 222-224.

71 - GRODSKY G.M., FORSHAM H.P. - An immunochemical assay of total extractable insulin in man. J. clin. Invest. 1960, 39, 1070-1075.

72 - GROEN J., KAMMINGA C.E., WILLEBRANDS A.F., BLICKMAN J.R. - Evidence for the presence of insulin in the blood serum. A method for an approximate determination of the insulin content of blood. J. clin. Invest., 1959, 31, 97-104.

73 - GUTTFREUND H. - The molecular weight of insulin and its dependence upon pH, concentration and temperature. Biochem. J., 1948, 42, 544-548.

74 - HAGEDORN H.C., JENSEN B.N., KRARUP N.B. - On protamine splitting properties of blood serum. J. Amer. med. Ass., 1936, 106-177.

75 - HAGEN J.H. - The effect of insulin on concentration of plasma glycerol. J. Lipid Research, 1963, 4, 1, 46-51.

76 - HALES C.N., RANDLE P.J. - Immunoassay of insulin with insulin antibody. Biochem. J., 1963, 88, 137-146.

77 - HALES C.N., RANDLE P.J. - Les techniques de dosage de l'insuline par un système à deux anticorps. Journ. ann. Diab.Hôtel Dieu. Flammarion ed. Paris, 1964, 5, 114-118.

78 - HARDING M.M., CROWFOOT-HODGKIN D., KENNEDY A.F., O'CONNOR - La structure cristalline de l'insuline. Une recherche sur les critaux rhomboédriques d'insuline et autres formes cristallines. J. Mol. Biol. 1966, 16, 212-226.

79 - HARFENIST E.J., CRAIG L.C. - The molecular weight of insulin. J. Am. chem. Soc., 1952, 74, 3087-3090.

80 - HARRIS J.L., LI C.H. - The biological activity of enzymatic digests of insulin. J. Am. chem. Soc., 1952, 74, 2945-2948.

81 - HARTEN M., WALZER M. - Allergy to insulin, liver, pituitary, pancreas, oestrogens, enzymes and similar substances. J. Allergy, 1940, 12, 72.

82 - HOUSSAY B.A., BIASOTTI A. - The hypophysis carbohydrate metabolism and diabetes. Endocrinology, 1931, 15, 511.

83 - HUMBEL R.E. - Biosynthesis of insulin. Amer. J. Med., 1966, 40, 672-675.

84 - Mc INTYRE N., HOLDSWORTH C.D., TURNER D.S. - New interpretation of oral glucose tolerance. Lancet, 1964, 2, 20-24.

85 - IZZO J.L., RONCONE A., IZZO M.J., BALE F.W. - Relation ship between degree of insulin iodination and its biological electrophoretic and immunochemical properties. J. biol. Chem., 1964, 239, 3749-3754.

86 - JENSEN R., ESPAGNE M. : - Sur un modèle moléculaire de l'insuline. Bull. Soc. Chim. biol., (à paraître).

87 - JENSEN R., RENAUD A. : - Aminoacides constitutifs des membranes cellulaires animales. Bull. Soc. Chim. biol., (à paraître).

88 - JESSUP D.C., WILBERG G.S. - Insulin bioassay using glycogen deposition in a single rat diaphragm. Diabetes, 1961, 10, 201.

89 - JØRGENSEN K.R. - Radioimmunoassay of insulin in plasma and urine in obese subjects. Acta endocr. (KBH), 1969, 607, 719-736.

90 - JOUZIER E. - Synthèse de l'insuline par un nouveau procédé de synthèse peptidique : la méthode en phase solide. Prod. et Prob. Pharm., 1969, 24, 313-321.

91 - JUNGAS R.L., BALL E.G. - Metabolism of adipose tissue. - In vitro, effets of insulin upon the metabolism of the carbohydrate and triglycéride stores of adipose tissue from fasted refed rats. Biochemistry, 1964, 3, 1696-1702.

92 - KATSOYANNIS P.G. - The chemical synthesis of human and sheep insulin. Amer. J. Med., 1966, 40, 652-661.

93 - KATSOYANNIS P.G., FUKUDA K., TOMETSKO A. - Insulin peptides. I - Synthesis of the chain A of insulin and its combination with natural B chain to generate insulin activity. J. Am. chem. Soc., 1963, 85, 2863-2865.

94 - KATSOYANNIS P.G., FUKUDA K., TOMETSKO A. - Insulin peptides II - Synthesis of the chain B of insulin and its combination with natural A chain to generate insulin activity. J. Am. chem. Soc., 1964, 86, 930-932.

95 - KIPNIS D.M., NOALL M.W. - Stimulation of aminoacid transport by insulin on the isolated rat diaphragm. Biochem. biophys. Acta., 1958, 28, 226-227.

96 - KONO T. - Destruction of insulin effector system of adipose tissue cells by proteolytic enzymes. J. biol. Chem., 1969, 244, 1772-1773.

97 - KORNER A. - Alloxan diabetes and in vitro protein synthesis in isolated rat liver microsomes and mitochondria. J. Endocr., 1960, 20, 256-260.

98 - KRALH M.E. - Incorporation of ^{14}C aminoacid precursors into adipose tissue protein. Biochem. biophys. Acta., 1959, 35, 556-560.

99 - KRALH M.E., MANCHESTER K.L. - Effect of insulin on incorporation of C^{14} from C^{14} labelled carboxylic acids and bicarbonate into the protein of isolated rat diaphragm. J. biol. Chem., 1959, 234, 2938.

100 - KUO J.F., DILL I.K., HOLMLUND C.E. - Effect of arsenite on lipolysis and metabolism of glucose, palmitic acid and aminoacids by isolated adipose cells. Biochem. biophys. Acta., 1967, 147, 683-688.

101 - LACY E.P. - Electron microscopy of islets cells of pancreas Amer. J. Med., 1961, 31, 851-856.

102 - LAGUESSE E.G. - Sur la formation des îlôts de Langerhans dans le pancréas. C.R. Soc. Biol. (Paris), 1893, 5, 819-829.

103 - LANGDON G.R. - Biological activity of phenylalanyl chain of insulin. J. biol. Chem., 1960, 235, 15-16.

104 - LAPRESLE C.L., GRABAR P. - Mise en évidence d'une impureté antigénique dans les préparations d'insuline et des anticorps correspondants dans le sérum de diabétiques. Rev. franç. Etud. Clin. Biol., 1957, 2, 1025-1029.

105 - LARNER J., ROSELL-PEREZ M., FRIEDMAN D.L., CRAIG J.W. - Insulin and the control of U.D.P.G. α - glucan - transglucosylase activity in control of glycogen metabolism. Ciba. Symp., 1964, 1, 273-276.

106 - LATCHFORD J.K., HEPBURN W. - Effect of insulin (pancreatic extract) on the sugar consumption of the isolated surviving rabbit heart. Amer. J. Physio., 1922, 62, 177.

107 - LAZAROW A. - Function and metabolism of islets cells. In LEIBEL loc. cit., 31-43.

108 - LEBEAU, JANOT M.M. - Insuline. Traité de Pharmacie Chimique et Organique, Masson edit., Paris 1956, 5, 3661-3674.

109 - LENS J., NEUTELINGS J. - The reduction of insulin. Biochem. biophys. Acta., 1950, 4, 501-506.

110 - LEONARD J.R., LANDAU B.R. - Assay of insulin and insulin like activity with rat epididymal fat. Lab. clin. Med., 1962, 60, 562-566.

111 - LEVINE R. - The action of insulin at the cell membrane. Amer. J. Med., 1966, 40, 691.

112 - LEVINE R., GOLDSTEIN M., KLEIN S., HUDDLESTUN B. - Action of insulin on the distribution of galactose in eviscerated nephrectomised dogs. J. biol. Chem., 1949, 179, 985-986.

113 - LINDERSTRØM-LANG K. - Deuterium-exchange between peptides and water. Symposium on peptide chemistry. Chem. Soc. Spec. publ., 1955, 2.

114 - LINDLEY H. - Some possible modifications of the α helix configuration involving chances of direction and sense of the helix. Biochem. biophys. Acta. 1955, 18, 194-201.

115 - LINDLEY H., ROLLET J.S. - An investigation of insulin structure by model building techniques. Biochem. biophys. Acta., 1955, 18, 183-193.

116 - LINDNER F. - Ueber ein genuines Depot-Insulin Präparat (Nativ-Insulin). Med. U. Chem., 1940, 4, 248. In RENOLD (154).

117 - LOUBATIERES A., MARIANI M.M., SARI L., SOREL G. - Stimulation de la sécrétion d'insuline par l'ouabaïne in vivo chez le chien. C.R. Soc. Biol., 1968, 162, 1589-1593.

118 - LOVELESS M.H., CANN K.R. - Distribution of "blocking antibody" in human serum proteins fractionnated by electrophoresis convection. J. Immunol., 1955, 74, 329-332.

119 - LOW B.M., EDSALL J.J. - Aspects of protein structure. In GREEN D.E. Currents in biochemical research. Interscience publ., New-York, 1956, 108-113.

120 - LOWEL F.T. - Evidence for existence of two antibodies for cristalline insulin. Proc. Soc. exp. Biol., 1942, 50, 167-169.

121 - LUBETSKI J. - Les effets physiologiques de l'insuline. Path. Biol., 1966, 14, 9-10, 584-590.

122 - LUKENS F.D.W. - Insulin and protein metabolism. In LEIBEL, loc. cit., 324-338.

123 - LYNGSØE J. - Serum insulin. Acta. med. scandinavica, 1965, 179, sup. 441.

124 - MADISON L.L. - The role of insulin in controlling carbohydrate metabolism in the liver. In LEIBEL, loc. cit., 103-121.

125 - MANCHESTER K.L., YOUNG F.G. - The effect of insulin, in vitro, on the accumulation of aminoacids by isolated rat diaphragm. Biochem. J., 1960, 75, 487-495.

126 - MARTIN D.N., RENOLD A.E., DAGENAIS Y.M. - An assay for insulin like-activity using rat adipose tissue. J. Lancet., 1958, 2, 76-82.

127 - Von MEHRING J., MINKOWSKI O. - Diabetes mellitus nach pancreasexstirpation. Arch. Exper. Path. Pharmak., 1889, 26, 371. In AUBERTIN (8).

128 - MENENDEZ J.C., HERSKOVITS T.T. - Optical rotatory dispersion and circular dichroism studies on insulin and its trypsin-modified derivatives. Arch. Biochem. Biophys., 1970, 103, 286-296.

129 - MERRIFIELD R.N. - Solid-phase peptide synthesis. Advanc. Enzymol., 1969, 32, 221-290.

130 - MEYER (de) - Thèse médecine, Doctorat spécial Sc. médico-chirurg., Bruxelles, 1910. In AUBERTIN (8).

131 - MIRSKY I.A. - Inhibiteurs antagonistes et inactivateurs dans l'étiologie du diabète. In HOCHSTER R.M. : Métabolic Inhibitors, vol 1, 660 p., Académic Press N.Y., 1963, 397-405.

132 - MIRSKY I.A., BROH-KAHN R.H. - The inactivation of insulin by tissue extracts. The distribution and properties of insulin inactivating extracts (insulinase). Arch. Biochem., 1949, 20, 1-6.

133 - MOORE S.T., SPACKMAN H.D., STEIN H.W. - Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. Analyt. Chem., 1958, 2, 1190-1206.

134 - MORGAN H.E., HENDERSON M.V., REGEN D.M., PARK C.R. The regulation of glucose uptake in heart muscle from normal and alloxan diabetic rats, the effects of insulin growth hormone, cortisone and anoxia. Am. New-York Acad. Sc., 1959, 82, 327-331.

135 - NARAHARA H.T., ÖZAND P. - Studies on tissue permeability. IX - The effect of insulin on the penetration of 3-methylglucose $3H_3$ in frog muscle. J. biol. Chem 1963, 238, 1, 40-49.

136 - NEVILLE D.M. - Isolation of cell membrane fraction. The J. of Biophys. Biochem. Cytology , 1960, 8, 413-420.

137 - NICOL D.S. (H.W.). - The biological activity of pure peptides obtained by enzymatic hydrolysis of insulin. Biochem. J., 1961, 75, 395.

138 - NICOL D.S.J.W., SMITH L.F. - Aminoacid sequence of human insulin. Nature (Lond.) 1960, 187, 483-486.

139 - OOMS H.A., FRANCKSON J.R.M., CONARD V. - Un cas d'allergie à l'insuline recristallisée. Le diabète. 1961, 8, 311-313.

140 - ORSETTI A., SCHMOUKER Y., CARTRY E., MIROUZE M.J. - Intérêt du dosage de l'insulinémie en diabétologie. Gaz. Med. France, 1968, 75, 15, 3095-3110.

141 - PARK C.R., POOT R.L., KALMAN C.E., WRIGHT J.H., JOHNSON L.H. - The transport of glucose and other sugars accross cell membranes and the effect of insulin. In WOLSTENHOLME, loc., cit., 240-259.

141' - PAULESCO N.C. - Recherche sur le rôle du pancréas dans l'assimilation nutritive. Arch. Inter. Phys., 1921, 17, 85-109.

141" - PAULESCO N.C. - Action de l'extrait pancréatique injecté dans le sang chez un animal diabétique. C.R. Soc. Biol., Paris, 1921, 85, 555-559.

142 - PAULING L., COREY R.B. - J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 5349-5352. In SCHERAGA, loc. cit.

143 - POFFENBARGER P.L., ENSINCK J. - The nature of human serum insulin-like-activity (I.L.A.) : characterisation of I.L.A. in serum and serum fractions. J. clin. Invest. 1968, 47, 301-320.

144 - POLLARD A., WALDRON C.B. - Automatic radioimmunoassay. In Automation in analytical chemistry. Technicon Symposia. 1966, 1, 49-56.

145 - PONZ F., PARES R., LLUCH M. - Influence d'agents d'action prépondérante dans la membrane sur le transport des sucres. Bull. Soc. Chim. biol., 1957, 2, 55-65.

146 - PORTER D.Jr., GRABER A.L., KUZUYA T., WILLIAMS R.J. - The effect of epinephrine on immunoreactive insulin levels in man. J. clin. Invest., 1967, 46, 228-233.

147 - POULSEN E.J. - Diabetes Mellitus - Acta endocr., 1966, 55, Sup. 118, 1-96.

148 - PRAISSMAN M., RUPLEY J.A. - Comparaison of protein structure in the crystal and in solution. Tritium-hydrogen exchange of zinc-free and zinc insulin. Biochemistry, 1968, 7, 2431-2445.

149 - PROUT T.E. - The chemical structure of insulin in relation to biological activity and to antigenicity. Metabolism., 1963, 12, 673-235.

150 - RANDLE P.J., SMITH G.H. - The effect of insulin, anaerobiosis and cell poisons on the penetration of isolated rat diaphragm by sugars. Biochem. J. 1958, 70, 501.

151 - RENOLD A.E. - Point de rencontre de la biochimie et de la médecine : le diabète sucré. Schweiz. Med. Wschr., 1964, 94, 7, 228-235.

152 - RENOLD A.E. - Aetiology of diabetes. Ciba. Symp., 1964, 15, 122-128.

153 - RENOLD A.E. - Action de l'insuline au niveau de la membrane plasmatique. Bull. Soc. Chim. biol., 1968, 50, 2481-2487.

154 - RENOLD A.E., CAHILL G.F. - Diabetes mellitus. In : The métabolic basis of inherited desease. Mc Grawill edit. Book Company, 2nd ed. 1 vol, 1475 p, 1966, Chapter 4, 69-101.

155 - RENOLD A.E., CROFFORD Q.B., BÜRGI F., FROESCH E.R. - Insulin and the metabolism of adipose tissu. In LEIBEL, loc., cit., 146-164.

156 - RENOLD A.E., MARTIN D.B., DAGENAIS Y., JURGEN D. - Measurement of small quantities of insulin-like activity using rat adipose tissue. A proposed procedure. J. clin. Invest., 1960, 39, 1487-1498.

157 - ROBERTSON J.D. - Ultrastructure of cell membranes and their derivatives. Biochem. J., 1957, 65, 349-354.

158 - ROBINSON F.A., FEHR K.L.A. - Estimation of protamine and insulin in protamine zinc insulin. Biochem. J., 1952, 51, 3, 298-303.

159 - RODBELL M. - Metabolism of isolated fat cells. I - Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. J. biol. Chem., 1964, 239, 375-380.

160 - RODBELL M. - The action of insulin on the plasma membrane of fat cells. Diabetes, 1968, 1, 31-36.

161 - ROSSELIN E.G. - Insulinémie et diabète. Path. Biol., 1966, 14, 598-611.

162 - ROSSELIN E.G., DOLAIS J. - Application de la méthode radioimmunologique au dosage de l'insuline humaine et au dosage de l'hormone F.S.H. Ann. Biol. clin., 1968, 26, 7-9, 763-791.

163 - SAMAAN N., FRASER R., DEMPTER W.J. - The typical and atypical forms of serum insulin. Diabetes, 1963, 12, 339-343.

164 - SAMAAN N., SLATER J.D., FRASER R., HILLMAN D. - Immunological studies with circulating insulin. Brit. med. Bull., 1961, 1, 1712-1715.

165 - SAMOLS E. - Immunochemical aspect of insulin. In LEIBEL, loc. cit., 227-246.

166 - SANGER F. - Chemistry of insulin. Brit. med. Bull., 1960, 16, 183-188.

167 - SANGER F., THOMPSON E.O.P. - The aminoacid squence in the glycyl chain of insulin. Biochemistry, 1953, 53, 353-366.

168 - SANGER F., TUFFY H. - The sequence in the phenylalanyl chain of insulin. Biochem. J., 1951, 49, 463-481.

169 - SCOTT D.A., FISHER A.M. - Studies on the pancreas and liver of normal and of zinc fed rat. Amer. J. Physiol., 1937, 21, 253.

170 - SHAW W.N., CHANCE R.E. - The effect of porcine proinsulin in vitro on adipose tissue and diaphragm of the normal rat. Diabetes, 1968, 17, 737-740.

171 - SHEPS C.M., NICKERSON R.J., DAGENAIS Y.M., STEINKE J., MARTIN D.B., RENOLD A.E. - Mesurement of small quantities of insulin-like-activity using rat adipose tissue. II - Evaluation of performance. J. clin. Invest., 1960, 39, 1499-1510.

172 - SJÖSTRAND F.S. - A new repeat structural element of mitochondrial and certain cytoplasmic membranes. Nature, 1963, 199, 1262-1264.

173 - SMITH L.F. - Species variation in the aminoacid sequence of insulin. Amer. J. Med., 1966, 40, 662-665.

174 - SOLOMON S.S., FENSTER F.L., ENSINCK J.W., WILLIAMS R.H. - Clearance studies of insulin and non supressible insulin like activity (NSILA) in the rat liver. Proc. Soc. exp. Biol., 1967, 126, 166-169.

175 - SORENSON R.L., STEFFES M.W., LINDALL A.W. - Subcellular localization of proinsulin to insulin conversion in insolated rat islets. Endocrinology, 1970, 86, 88-96.

176 - STADELMAN R., NAUNYM D.B. - Der diabetes Mellitus. Specielle Pathologie und Therapie, Wien, 1900, 127-207.

177 - STADIES W.C.N, HAUGAARD N., VAUGHAN M. - The quantitative reaction between insulin and its biological activity. J. biol. Chem., 1953, 200, 745-752.

178 - STEINER D.F., CUNNIGHAM D., SPIGELMAN L., ATEN B. - Insulin biosynthesis. Evidence for a precursor. Science, 1967, 157, 697-700.

179 - STEINER D.F., CHO S., BAYLESS D., HALLUND O. - On the isolation and some properties of bovine proinsuline. Diabetes, 1968, 17, sup. 1, 309-313.

180 - TAKEUCHI M., TERAYAMA H. - Composition of rat liver cell membrane. Exp. cell. Research., 1965, 40, 30-44.

181 - TRIA E., BARNABEI O. - Lipoproteins and lipopeptides of cell membranes. In TRIA, loc. cit., 170-180.

182 - TRIA E., BARNABEI O. - Presence of a phosphatido - peptide fraction in liver cell membrane and its possible role in the active transport. Nature, 1963, 9, 598.

183 - VALLANCE-OWEN J.M.A. - Insulin antagonists. Brit. Med. Bull., 1960, 16, 3, 214-218.

184 - VALLANCE, OWEN J., HURLOCK B. - Estimation of plasma-insulin by rat diaphragm method. Lancet, 1954, 1, 68.

185 - VAGUE P. - L'insulinémie dans le diabète et les obésités. Dosage radio-immunologique au cours de 250 explorations dynamiques. Thèse Doct. Med., Marseille, 1966.

186 - Du VIGNEAUD V., JENSEN H., WINTERSTEINER O. - Crystallisation of insulin and the nature of the S - linkage and isolation of cystine and tyroxine from hydrolysed crystalline Insulin. J. Pharmacol., 1928, 32, 367-386.

187 - Du VIGNEAUD V., RESSLER G., SWAN J.M., ROBERTS C.W., KATSOYANNIS P.G., GORDEN S. - The synthesis of a octapeptide amide with the hormonal activity of ocytocin. J. Am. chem. Soc., 1953, 75, 4879-4882.

188 - WALLIS C., LEWIS R., MELNICK J. - Preparation for kidney cell cultures. Proc. Soc. exp. Biol., 1955, 86, 194-197.

189 - WANG S.S., CARPENTER F.H. - A compositional assay for insulin applied to a search for "proinsulin". J. biol. Chem., 1965, 240, 1619-1625.

190 - WARDLAW A.C., MOLONEY P.J. - The assay of insulin with mouse diaphragm. Canad. J. Physiol., (Lond.) 1961, 39, 635-698.

191 - WAUGH F. David - A concept of the three dimensional structure of insulin. In WOLSTENHOLME, loc. cit., 122-132.

192 - Von WEBER U. - Synthese einer Insulin. A-Kette nach der Merrifield methode unter Verwendung der S-Äthyl-mercapto-Schutzgruppe. Hoppe. Seyler's Z. Physiol. Chem., 1969, 350, 1421-1424.

193 - Von WEBER U., HERZOG K.H., GROSSMANN H., HÖRNLE S., WEITZEL G. - Struktur und Wirkung von Insulin. VI - Synthese stark variierter A-Ketten unter Verwendung der S. Äthylmercapto - Schutzgruppe. Hoppe. Seyler's Z. Physiol. Chem., 1969, 350, 1425-1429.

194 - Von WEBER U., HÖRNLE S., GRIESER G., HERZOG K.H., WEITZEL G., - Struktur und Wirkung von Insulin. II - Synthetische A-Ketten mit variierter sequenz. Hoppe. Seyler's Z. Physiol. Chem., 1967, 348, 1715-1717.

195 - Von WEBER U., WEITZEL G. - Struktur und Wirkung von Insulin. V - Synthetische B-Ketten mit variierter Sequenz. Hoppe. Seyler's Z. Physiol. Chem., 1968, 349, 1431-1433.

196 - WEIS L.S., NARAHARA A.T. - Regulation of cell membrane permeability in skeletal muscle. I - Action of insulin and trypsin on the transport system for sugars. J. biol. Chem., 1969, 244, 3084-3091.

197 - WINEGRAD A.I., RENOLD A.E. - Studies on rat adipose tissue in vitro. I - Effects of insulin on the metabolism of glucose, pyruvate, acetate. J. biol. Chem., 1958, 233, 267-270.

198 - WINTERSTEINER O., Du VIGNEAUD V., JENSEN H. - The distribution of nitrogen in cristalline insulin. J. Pharmacol., 1928, 32, 397.

199 - WOOL I.G., KRAHL M.E. - Incorporation of C^{14} aminoacids into protein of isolated diaphragm : an effect of insulin independant glucose entry. Amer. J. Physiol., 1959, 196, 961.

200 - WOOL I.G., MOYER A.N - Effect of actinomycin and insulin on the metabolism of isolated rat heart. Biochim. biophys. Acta., 1964, 91, 248-52.

201 - WOOL I.G., RAMPERSAD O.R., MOYER A.N. - Effect of insulin and diabetes on protein synthesis by ribosomes from heart muscle. Amer. J. Med., 1966, 40, 716-721.

202 - WRENSHALL G.A., BOGOCH A., RITCHIE R.C. - Extractable insulin of pancreas : correlation with pathological and clinical findings in diabetic and non diabetic cases. Diabetes, 1952, 1, 87-91.

203 - YALOW R.S., BERSON S.A. - Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. J. clin. Invest., 1960, 39, 1157-1162.

204 - YALOW R.S., BERSON S.A. - Immunologic aspects of insulin. Am. J. Med., 1961, 31, 882-891.

205 - YOUNG F.G. - Permanent experimental diabetes produced by pituitary (anterior lobe) injections. Lancet, 1937, 2, 372-374.

206 - YOUNG F.G., CARPENTER F.J. - Isolation and characterization of products formed by action of trypsin on insulin. J. biol. Chem., 1961, 236, 743-749.

207 - YOUNGNER J.A. - Monolayer tissue cultures - Preparation and standardization of suspension of trypsin dispersed monkey cells. Proc. Soc. exp. Biol., 1954, 85, 2022-2025.

208 - ZAHN H. - Synthesis of the B chain of human and bovine insulin by the Merifield solid-phase synthesis. Macromolecular Rev., 1969, 121, 87-101.

209 - ZAHN H. - Synthesis der Insulin Ketten und deren Kombination zu biologisch aktiven präparaten.
Z. Ges. Textilindust., 1964, 66, 197-200.
In DIXON (48).

210 - ZIERLER K.L. - Possible mechanisme of insulin action in membrane potentiel and fluxes.
Amer. J. Med., 1966, 40, 735-739.

TABLES DES MATIERES

Pages

AVANT-PROPOS 1
INTRODUCTION 5

PREMIERE PARTIE - Connaissances actuelles sur l'insuline 13

Chapitre I : La molécule d'insuline 15

I - Structure Primaire 16
II - Structure Secondaire 21
III - Structure Tertiaire 22
IV - Structure Quaternaire 22
V - Synthèse 25

Chapitre II : Métabolisme de l'insuline 29

I - Biosynthèse 29
II - Sécrétion 32
III - Transport 33
IV - Dégradation 34

Chapitre III : Propriétés de l'insuline 37

I - Action sur les lipides 38
II - Action sur les protides 39
III - Action sur les oses 39
IV - Propriétés antigéniques 41

Chapitre IV : Dosage de l'insuline 45

I - Méthodes biologiques 46
II - Méthodes immunologiques 48

DEUXIEME PARTIE - Travaux Personnels 51

Chapitre I : Dosage radioimmunologique de l'insuline 55

I - Principe 55
II - Technique 57
III - Résultats 64
Conclusion 68

Chapitre II : Essais biologiques 71

I - Technique analytique 73
II - Protocole expérimental 76
III - Résultats 81
Conclusion 98

Chapitre III : Introduction au modèle moléculaire de l'insuline 103

I - Structure des membranes 104
II - Action de l'insuline au niveau de la membrane cellulaire 108
III - Rapports entre l'action biologique de l'insuline et sa structure 111

Chapitre IV : Modèle moléculaire de l'insuline. 117

I - Théorie du modèle 118
II - Construction du modèle 125
III - Discussion 135

CONCLUSIONS GENERALES 141
BIBLIOGRAPHIE 145

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté :

LES PLACEBOS